

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**RÉGULATION DE LA MORT CELLULAIRE PAR GIMAP5 (GTPase OF THE
IMMUNE ASSOCIATED PROTEIN FAMILY) DANS LES LYMPHOCYTES T DU
RAT.**

Par

Mamadou KEITA

Département de pédiatrie, Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
maître en sciences (M. Sc.) en immunologie

..... 2007



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-42969-3
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-42969-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

L'apoptose spontanée des lymphocytes T entraîne une lymphopénie marquée dans les rats BBDP (BioBreeding Diabetes Prone) conduisant au développement du diabète auto-immun de type I. Le phénotype de la lymphopénie dans ces rats est lié au locus *lyp*. L'allèle *lyp* contient une mutation du cadre de lecture à l'intérieur du gène qui code pour GIMAP5 (GTPase of immunity associated nucleotide binding protein 5). Cette mutation produit une protéine tronquée de 11 Kd. Les mécanismes par lesquels, GIMAP5 assure la fonction de survie des lymphocytes T ne sont pas bien connus. Cependant, des études antérieures ont montré que l'apoptose précoce des cellules T matures était indépendante des caspases, mais est associée à la perte du potentiel de la membrane mitochondriale. D'autres études de surexpression ont montré que GIMAP5 localise dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. En utilisant un antisérum de lapin contre GIMAP5, nos résultats ont montré que la protéine GIMAP5 endogène est associée à une fraction subcellulaire sédimentable distincte de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique dans les lymphocytes T matures de rat normaux. Pour confirmer davantage ces données par la microscopie confocale, nous avons surexprimé rGIMAP5 étiqueté par myc à la partie N-terminale dans les fibroblastes Rat-2, la partie C-terminale transmembranaire étant intacte. Nos résultats suggèrent que GIMAP5 régule l'intégrité de la membrane mitochondriale dans une fraction subcellulaire différente des mitochondries.

Mots clés : GIMAP5; lymphopénie; rats BBDP; diabète de type I ; mitochondries; lymphocytes T

1- INTRODUCTION	1
1.1 Développement et homéostasie des lymphocytes T	1
1.5.5- Maturation thymique	1
1.5.6- Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T	3
1.2 L'apoptose des lymphocytes T	6
1.2.1 La voie extrinsèque	6
1.2.2 La voie intrinsèque	8
1.3 Le diabète de type I	9
1.4 Model du rat BBDP	11
1.4.1- Physiopathologie du diabète chez le rat BBDP	11
1.4.2 Les gènes de susceptibilité au diabète de type I	13
1.4.3 Le phénotype de la mutation lyp	13
1.5 Les protéines de la famille GIMAP	15
1.5.1 Caractéristiques des protéines de la famille GIMAP	15
1.5.2 Nomenclature des protéines de la famille GIMAP	15
1.5.3 GIMAP5 chez l'homme (hGIMAP5)	18
1.5.4- GIMAP5 chez la souris (mGIMAP5)	19
1.5.5- GIMAP5 chez le rat (rGIMAP5)	20
1.5.5.1- Structure de rGIMAP5	20
1.5.5.2 Localisation tissulaire et expression de rGIMAP5	23
1.5.5.3 Fonctions de rGIMAP5	23
2- OBJECTIF	24
3- MATERIEL ET METHODES	25
3.1- Les animaux	25
3.2- Les anticorps et les réactifs	25
3.3- Culture cellulaire	26
3.4- Isolement des cellules et fractionnement cellulaire	26
3.5- Immunobuvardage de type western	27
3.6 - RT-PCR	28
3.7- Construction du plasmide	29

3.8- Technique d'immunofluorescence	30
4- RESULTATS	32
4.1- Génération de l'anticorps anti-GIMAP5.....	32
4.2- Expression de la protéine endogène rGIMAP5 dans les cellules T primaires de rat ACI.1u gimap5+/+	34
4.3- La distribution différentielle de rGIMAP5 dans les lymphocytes T de rat sous différentes conditions de lyse.....	35
4.4- rGIMAP5 est associée à un compartiment cellulaire distinct dans les cellules T primaires de rat ACI.1u gimap5+/+	37
4.5- Étude de la colocalisation de rGIMAP5 dans les organelles par microscopie confocale	39
4.5.1- Etude de la colocalisation de GIMAP5 avec Bcl-2.....	39
4.5.2- Dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique	40
4.5.3- Dans l'appareil de golgi, les endosomes précoces et le noyau	42
4.5.4- Dans le cytosquelette, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les jonctions serrées	43
5- DISCUSSION.....	45
6- CONCLUSION.....	50
7- REMERCIEMENT.....	51
8- REFERENCES.....	53

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1: Maturation du lymphocyte T dans le thymus.....	3
Figure 2: Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T matures par apoptose	5
Figure 3 : Les deux principales voies d'apoptose.....	9
Figure 4 : Structure histologique des ilots de Langerhans du pancréas au cours du diabète de type I chez le rat.....	12
Figure 5 : Structure de mGIMAP5.....	20
Figure 6 : Locus des protéines GIMAP chez le rat.....	21
Figure 7 : Structure de rGIMAP5.....	22
Figure 8 : Structure troquée de la protéine rGIMAP5 résultant de la mutation lyp ...	22
Figure 9: Reconnaissance de la protéine entière GIMAP5 et non la protéine tronquée par l'anticorps généré.....	33
Figure 10: Expression de GIMAP5 dans les lymphocytes T de rat ACI.1u <i>gimap5</i> ^{+/+}	35
Figure 11: Co-séparation à 150 psi de rGIMAP5 dans la fraction P10 contenant la mitochondrie et le RE.....	36
Figure 12: Expression de la protéine native rGIMAP5 dans la fraction 5 du gradient de sucrose réalisé à partir des cellules des ganglions lymphatiques de rat ACI.1u <i>gimap5</i> ^{+/+}	38
Figure 13 : Absence de colocalisation de Bcl-2 avec GIMAP5	40
Figure 14: Absence de colocalisation de rGIMAP5 avec la mitochondrie et le réticulum endoplasmique	41
Figure 15: rGIMAP5 ne colocalise pas avec l'appareil de golgi, les endosomes précoces et le noyau	43
Figure 16: rGIMAP5 n'est pas exprimée dans le cytosquelette, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les jonctions serrées	44

Liste des tableaux

Tableau I : Nomenclature et fonctions des protéines GIMAP.....	17
Tableau II : Les amorces pour la RT-PCR	28
Tableau III : Programmation des cycles du PCR.....	29
Tableau IV : Liste des anticorps primaires et colorants utilisés pour le marquage des organelles et protéines.....	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ACAD	activated T cell autonomous death
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AICD :	Activation-induced cell death
AIG1	avrRpt2-induced gene
Apaf-1	apoptotic-protease-activating factor-1
APC :	Antigen presenting cell
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ART2	ADP-ribosyltransferase 2
Bax	Bcl-2 associated X protein
BDP	Biobreeding diabetes prone
BBDR	Biobreeding diabetes resistant
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BSA	Bovine Serum-Albumin
Caspase	CysteinyI ASPartate protéASES
CD :	Cluster of Differentiation
CMH :	Complexe majeur histocompatibilité
CTL :	Cytotoxic T lymphocytes
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
DC :	Dendritic cell
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DID	diabète insulino-dépendant
DISC	Death inducing signaling complex
DN :	Double négatif (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP :	Double positif (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
EEA1	Early endosome antigen 1
FADD	Fas associated death domain
FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein

GDP	Guanosine diphosphate
GIMAP :	GTPase of the immune associated protein
GM130	Golgi Matrix 130
GTP	Guanosine triphosphate
hGIMAP5	Human GIMAP5
HLA	Human leucocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IAN	Immune associated nucleotide
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobulin
IL :	Interleukin
Kb :	Kilo base
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
mGIMAP5	Mouse GIMAP5
NK :	Natural killer
NOD :	Non-Obese Diabetic
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
psi	Pounds per square inch
rGIMAP5	Rat GIMAP5
RTE :	Recent thymus emigrant
RT-PCR	Reverse-Transcriptase & Polymerase Chain Reaction
SCF :	Stem cell factor
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SP :	Simple positif (CD4 ⁺ ou CD8 ⁺)
TBS	Tris Buffered Saline
TCR :	T Cell Receptor
TGFβ	transforming growth factor β
Th :	T helper

TNF : Tumour necrosis factor
T_{reg} : Lymphocyte T régulateur
UV Ultra Violet

1- INTRODUCTION

Le système immunitaire protège l'organisme contre les infections par le déploiement de deux lignes de défense soit l'immunité innée ou naturelle et l'immunité acquise. L'immunité innée est constituée majoritairement par les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. L'immunité spécifique ou acquise est caractérisée par une sélection clonale des lymphocytes T et B portant des récepteurs spécifiques à l'antigène permettant au système immunitaire de reconnaître les agents étrangers. Durant la réponse immunitaire, les lymphocytes spécifiques à l'antigène prolifèrent et se différencient en cellules effectrices pour éliminer les pathogènes. Les cellules T cytotoxiques tuent les cellules cibles infectées, alors que les lymphocytes T auxiliaires activent principalement les cellules B et les macrophages.

1.1 Développement et homéostasie des lymphocytes T:

1.5.5- Maturation thymique

Le développement des lymphocytes T prend place dans le thymus. Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (ou du foie foetal de l'embryon) entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. Ces cellules expriment fortement CD44 (Pgp-1) et faiblement Thy-1, HSA (Heat stable antigen) avec l'absence d'expression de CD25 (récepteur de la chaîne α de l'IL-2) (Shortman, K. et al. 1996). L'expression de CD117 (récepteur du CSF, c-kit) et du récepteur de l'IL-7 permettent la survie et la croissance de ces cellules vers le stade Pro-T.

Les thymocytes pro-T sont caractérisés par l'expression de CD25 en plus des autres marqueurs des progénitures lymphoïdes thymiques (Godfrey, D. I. et al. 1993). A ce stade a lieu l'induction de protéines régulatrices de gène telles que NF- κ B, NF-AT et AP-1 avec acquisition du phénotype de cellules activées (Rothenberg, E. V. 1992). La commutation vers la lignée de cellules T et la prolifération de ces cellules abouti aux cellules Pre-T précoces.

Les cellules Pre-T précoces n'expriment pas CD44 et CD117, mais expriment fortement CD25. Ces cellules initient le réarrangement du gène de la chaîne β du TCR (Penit, C. et al. 1995) qui permet la sélection β des thymocytes pour devenir des cellules Pre-T tardives.

Les cellules Pre-T tardives sont caractérisées par la perte de l'expression de CD25. Elles expriment le Pre-TCR composé de la chaîne β du TCR et de la chaîne Pre-T α (Saint-Ruf, C. et al. 1994). A ce stade, commence le réarrangement et l'expression du locus de la chaîne α du TCR. Le pre-TCR permet d'assurer la survie, la prolifération et la différenciation des cellules pre-T tardives en thymocytes double positifs (DP) (Penit, C. et al. 1995). Le TCR $\alpha\beta$ fonctionnel exprimé sur les thymocytes DP est essentiel pour le processus de sélection positive et négative formant le répertoire des cellules T (Sebzda, E. et al. 1999).

La sélection positive est un processus au cours duquel sont sélectionnés les thymocytes DP qui reconnaissent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) portant l'antigène du soi. Ceux n'ayant aucune affinité pour les molécules du CMH meurent par négligence (Surh, C. D. et al. 1994; von, Boehmer H. 1994). La sélection négative permet d'éliminer, par apoptose, les thymocytes DP potentiellement autoréactifs dont le TCR reconnaît un antigène du soi avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'hôte avec haute affinité (Nossal, G. J. 1994). Dans les cellules T matures, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL assurent la survie des thymocytes DP lors de la sélection positive (Grillot, D. A. et al. 1995), alors que la sélection négative est assurée par les récepteurs de mort de la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R) (Page, D. M. et al. 1998).

Au terme de la sélection thymique, les lymphocytes T DP positifs poursuivent leur maturation en lymphocytes T simple positif (SP) CD4⁺ ou CD8⁺. Cette maturation en lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ dépend de leur interaction avec les molécules du CMH de classe II (CMH-II) ou de classe I (CMH-I) respectivement.

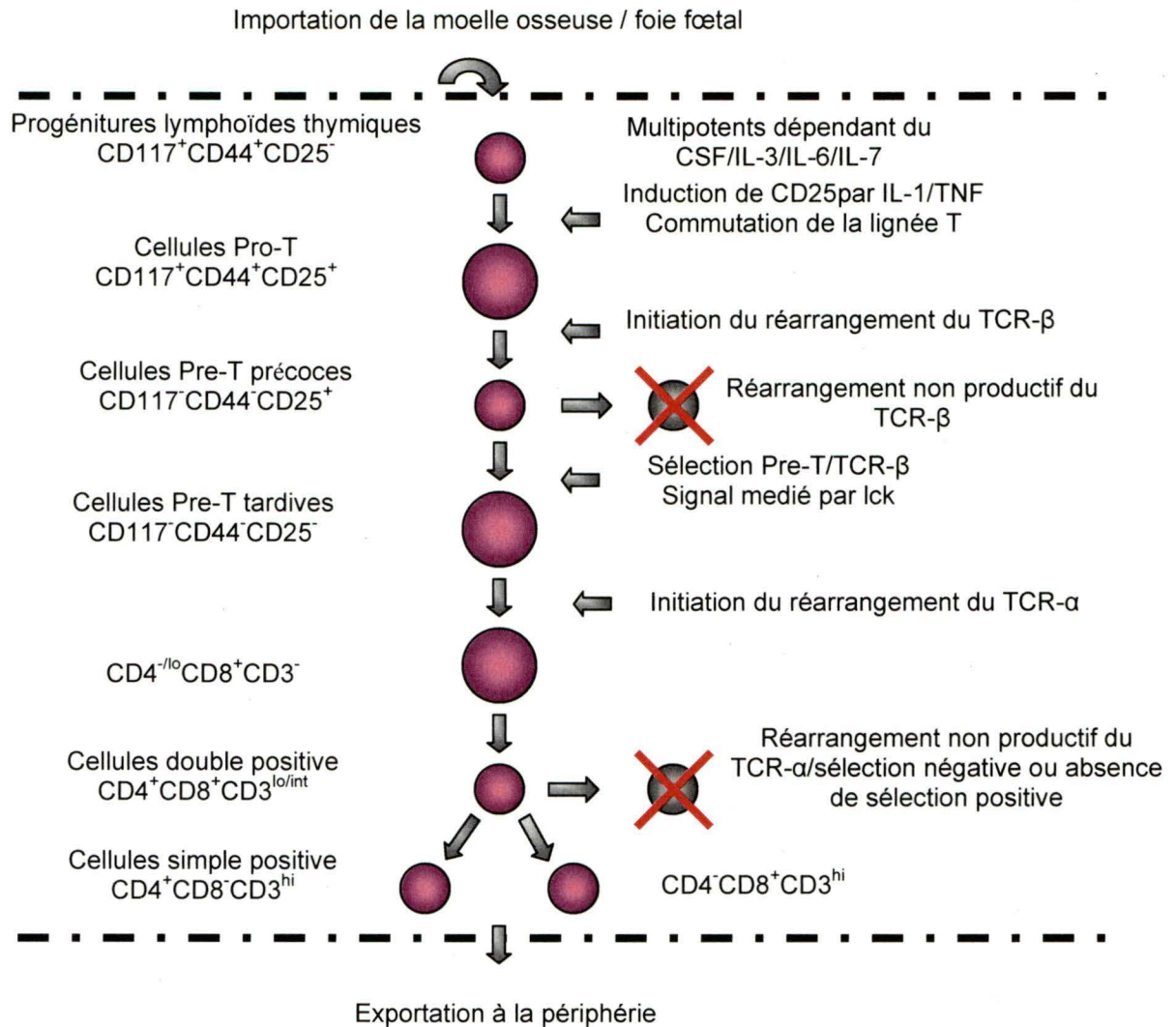


Figure 1: Maturation du lymphocyte T dans le thymus (Zlotnik, A. et al. 1995)

1.5.6- Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T

Après la maturation dans le thymus, les cellules T naïves circulent à travers la circulation sanguine et les organes lymphoïdes périphériques. La régulation homéostatique assure le maintien de la taille de la population des lymphocytes T, même après une expansion clonale et une contraction des lymphocytes T suivant une réponse immunitaire contre un pathogène (Freitas, A. A. et al. 2000; Marrack, P. et al. 2000). Cette taille reste relativement constante durant la vie.

Pour les cellules T naïves, cela implique d'une part un équilibre entre les facteurs qui augmentent leur nombre, à savoir la prolifération et l'apport des cellules T venant du thymus, et d'autre part les facteurs qui diminuent leur nombre dont la mort cellulaire et la différenciation en cellules T mémoires (figure 2). En l'absence d'antigène, la prolifération homéostatique permet aux cellules T naïves de remplir l'espace libre dans les organes périphériques secondaires (Dummer, W. et al. 2001). Cette expansion optimale est assurée par deux signaux de survie dont l'interleukine 7 (IL-7) produit par les cellules stromales, et l'interaction TCR/CMH (Tan, J. T. et al. 2001). Ainsi l'IL-7 médie cette fonction via la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Akashi, K. et al. 1997).

En présence d'un stimuli antigénique, le signal du TCR en concert avec le signal des molécules de costimulation activent les cellules T pour induire leur prolifération (Crabtree, G. R. 1989). La phase d'activation initiale est caractérisée par l'induction des gènes de l'interleukine 2 (IL-2) et de son récepteur de haute affinité. Au cours de cette phase il y a inhibition de l'apoptose pour permettre le développement de la réponse immune. La phase de prolifération intervient après engagement de l'IL-2 à son récepteur pour initier le cycle cellulaire. Au terme de un ou de plusieurs cycles cellulaires les cellules T deviennent susceptibles à l'apoptose suite à l'engagement du TCR (Boehme, S. A. et al. 1993). Suivant les conditions de la réponse immune, les cellules meurent par apoptose active ou passive. L'apoptose active ou mort cellulaire induite par activation (AICD) ou voie extrinsèque est dépendante de l'antigène (Green, D. R. et al. 2003; Krammer, P. H. 2000), elle est induite par les récepteurs de mort de la famille du facteur nécrosant du tumeur (TNF). L'apoptose passive ou mort autonome des cellules T activées (ACAD) est appelée voie intrinsèque (Hildeman, D. A. et al. 2002b). Cette voie est indépendante de l'antigène et est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. La disponibilité limitée de l'IL-2 au pic de l'expansion clonale est l'un des facteurs qui induit l'apoptose passive (Duke, R. C. et al. 1986). Cependant certaines cellules survivent et deviennent des cellules T mémoires sous l'effet combiné de l'IL-7 et l'IL-15 (Flynn, K. J. et al. 1998; Jenkins, M. K. et al. 2001). Ces deux cytokines exerceraient leur effet de survie par la surexpression de Bcl-2 pour s'opposer à l'apoptose induite par Bim (Schluns, K. S. et al. 2003).

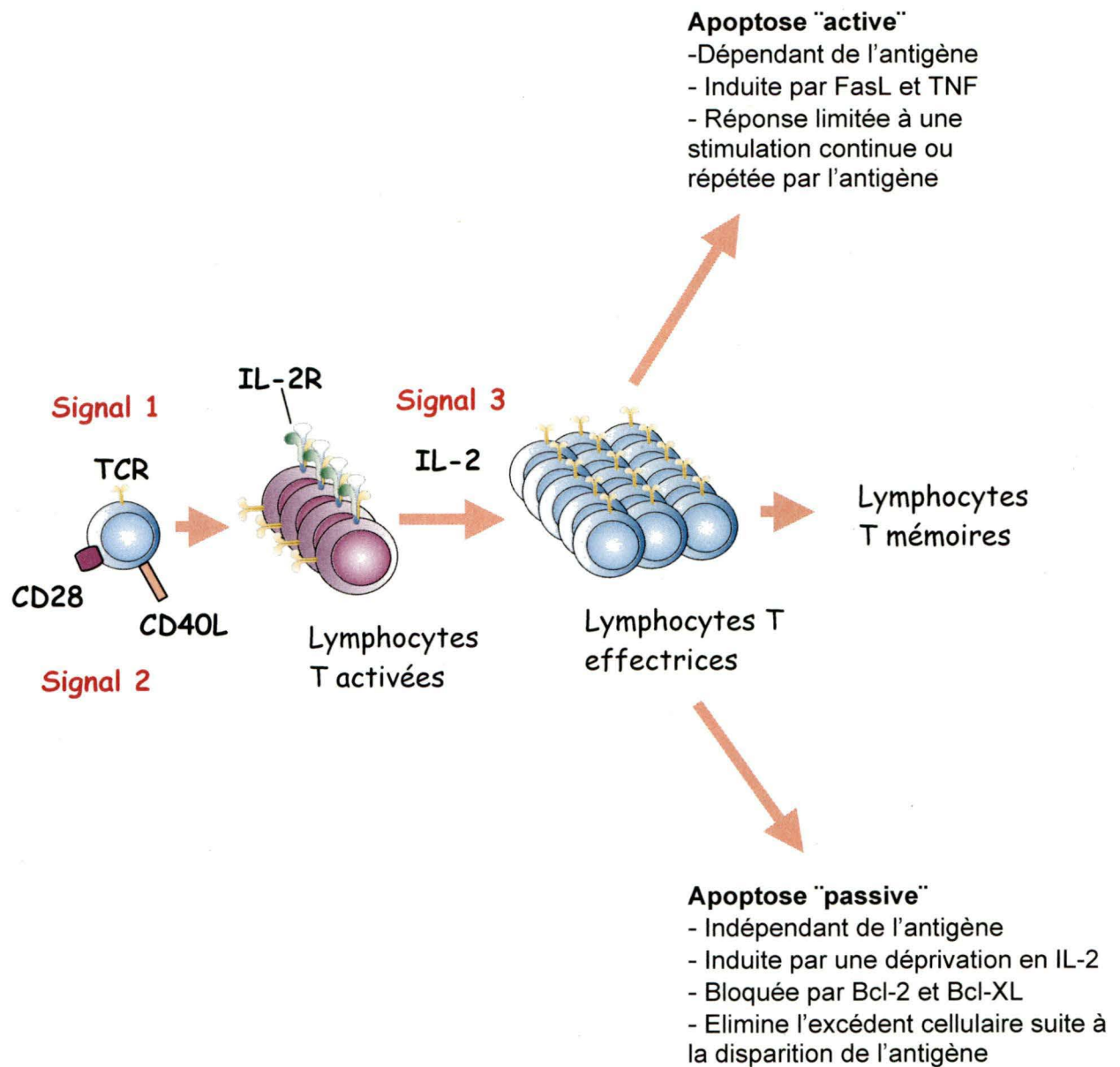


Figure 2: Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T matures par apoptose

L'activation lymphocytaire à un antigène se produit en deux étapes, sous le contrôle de l'IL-2, des cellules fortement susceptibles à l'apoptose. Ces cellules meurent, soit de façon active suite à une forte stimulation secondaire à l'antigène, ou de façon passive en l'absence d'antigène et d'IL-2. Inspiré de l'article de Lenardo (Lenardo et al., 1999).

1.2 L'apoptose des lymphocytes T:

La mort cellulaire apoptose (mort cellulaire programmée) joue un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes T. Une cellule en apoptose se caractérise par de nombreux changements morphologiques comme la formation de corps apoptotiques sur la membrane plasmique, la condensation du noyau et la dégradation de l'ADN en "barreaux d'échelle" (Kerr, J. F. et al. 1972). L'apoptose des lymphocytes T conduit à l'activation d'une famille de protéases à cystéines intracellulaires appelées caspases (Nicholson, D. W. 1999). Les caspases, initialement synthétisées sous forme de proenzymes sont clivées en enzymes actives après induction de l'apoptose. Cependant des protéases autres que les caspases comme les cathepsines libérées par les lysosomes peuvent contribuer à l'AICD et à l'ACAD de façon indépendante des caspases (Spaner, D. et al. 1999). Ainsi, on distingue deux voies d'apoptose.

1.2.1 La voie extrinsèque :

L'AICD est un mécanisme qui permet de réduire le nombre de cellules T effectrices à la fin de la réponse immune et d'éliminer les cellules autoréactives à la périphérie (Locksley, R. M. et al. 2001).

L'apoptose peut être induite par une variété de stimuli notamment ceux qui agissent sur les récepteurs de mort. Ces récepteurs transmembranaires de type I appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R) (Nagata, S. 1997) et comprennent un domaine de mort intracellulaire DD (Death Domain) qui intervient dans la transduction du signal apoptotique. Les récepteurs de mort comportent plusieurs membres connus notamment TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-2 (DR5/KILLER/TRICK2) et DR6 (Ashkenazi, A. et al. 1999; Schulze-Osthoff, K. et al. 1998). CD95, qui représente le prototype des récepteurs de mort, est le mieux caractérisé (Kirchhoff, S. et al. 2000; Krammer, P. H. 1999).

La liaison de Fas (CD95) à son ligand (CD178) induit son oligomérisation avec recrutement de la molécule FADD (Fas Associated protein with Death Domain) par leur domaine DD. En plus, FADD possède un domaine effecteur de mort DED (Death Effector Domain) à l'extrémité N-terminal, qui peut se lier à la procaspase 8 pour former un complexe de signalisation DISC (Death inducing signaling complex) induisant la mort. La procaspase 8 est clivée du DISC pour former la caspase 8 active qui est un tétramère composé de deux sous-unités p10 et p18 (Medema, J. P. et al. 1997). La caspase 8 induit la cascade des caspases effectrices notamment la caspase 3 et la caspase 7 qui clivent différents substrats pour induire l'apoptose (Salvesen, G. S. et al. 1999). Dans certaines conditions lorsque la stimulation du récepteur de mort n'est pas suffisante pour l'exécution directe de l'apoptose, il y a activation de la voie intrinsèque par la caspase 8 qui clive la protéine Bid de la famille de Bcl-2 en Bid tronquée (Scaffidi, C. et al. 1998; Scaffidi, C. et al. 1999).

L'apoptose par les récepteurs de mort peut être modulé à plusieurs niveaux notamment par le statut de glycosylation de CD95 (Keppler, O. T. et al. 1999). La molécule FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) qui est un homologue de la caspase 8, mais ne possédant pas de site catalytique peut inhiber l'apoptose en bloquant le clivage de la procaspase 8 (Golks, A. et al. 2005; Krueger, A. et al. 2001). Au niveau transcriptionnel la protéine suppressive de tumeur p53 augmente l'expression de CD95 après dommage à l'ADN (Muller, M. et al. 1998).

L'implication de CD95 et CD95L dans la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T a été démontrée chez des souris *lpr/lpr* et *gld/gld*, déficientes respectivement pour CD95 et CD95L. Ces souris développent une maladie lymphoproliférative avec production d'autoanticorps (Takahashi, T. et al. 1994; Watanabe-Fukunaga, R. et al. 1992). Cependant, la délétion de CD95 chez les lymphocytes T entraîne la déplétion des cellules T et la fibrose pulmonaire (Hao, Z. et al. 2004). Ainsi, l'inactivation de CD95 est insuffisante pour induire un phénotype lymphoprolifératif, et suggère l'implication de la voie intrinsèque dans la mort des cellules T activées (figure 3).

1.2.2 La voie intrinsèque :

La mort cellulaire par la voie intrinsèque ou ACAD dépend surtout de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Kroemer, G. 1997). En effet pendant la phase effectrice de l'apoptose, le cytochrome c est libéré à partir des mitochondries suite à l'ouverture des pores de transition. Le cytochrome c se lie à Apaf-1 (apoptotic-protease-activating factor-1) pour former le complexe apoptosome dans le cytoplasme. Le clivage de la caspase 9 dans l'apoptosome entraîne l'activation des caspases -3 et -7 qui sont des caspases effectrices pour induire la mort cellulaire (Lavrik, I. N. et al. 2005). Ce clivage par les caspases effectrices est commun aux deux voies de l'apoptose.

Dans l'ACAD où les cellules T meurent par apoptose sans stimulation du TCR, la mort cellulaire est déterminée par le ratio entre les protéines pro-apoptotique et anti-apoptotique de la famille Bcl-2 sur la mitochondrie (Hildeman, D. A. et al. 2002a; Strasser, A. et al. 2004). Cette famille de protéines se caractérise par la présence de domaines BH1 à 4 (Bcl-2 homology domain) (Kelekar, A. et al. 1998) et peuvent être classées en anti-apoptotiques et pro-apoptotiques (Gross, A. et al. 1999; Vander Heiden, M. G. et al. 1999). Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 et Boo et les pro-apoptotiques Bax, Bak, Bad, Bok et Diva sont caractérisés par quatre domaines BH1, 2, 3 et 4. Par contre les protéines pro-apoptotiques telles que Bik, Hrk, Bim, et BNIP3 ne possèdent qu'un seul domaine BH3. Certaines protéines comme Bcl-2, Bcl-XL, Bak et Bax partagent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être ciblées sur la membrane du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Les études menées sur les mitochondries ont montré que Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome c (Kluck, R. M. et al. 1997) alors que Bax est capable de l'induire avec perte du potentiel de membrane mitochondriale (Jurgensmeier, J. M. et al. 1998).

Les protéines Bcl-2, Bcl-XL, Bid et Bax ont une structure similaire à celle du domaine formant des pores de certaines toxines bactériennes et semblent avoir la capacité de former des pores sur les membranes artificielles. Des études ont montré que l'homooligomérisation de Bax et Bak par tBid activé par la caspase 8 entraîne la

libération du cytochrome c des mitochondries (Wei, M. C. et al. 2001). Chez les cellules normales, Bax est présent dans le cytosol sous forme de monomères et est faiblement associé aux mitochondries. Après induction de l'apoptose, il y a oligomérisation et translocation de Bax sur la membrane mitochondriale. Cette insertion de Bax peut être bloquée par Bcl-2 (Antonsson, B. et al. 2001).

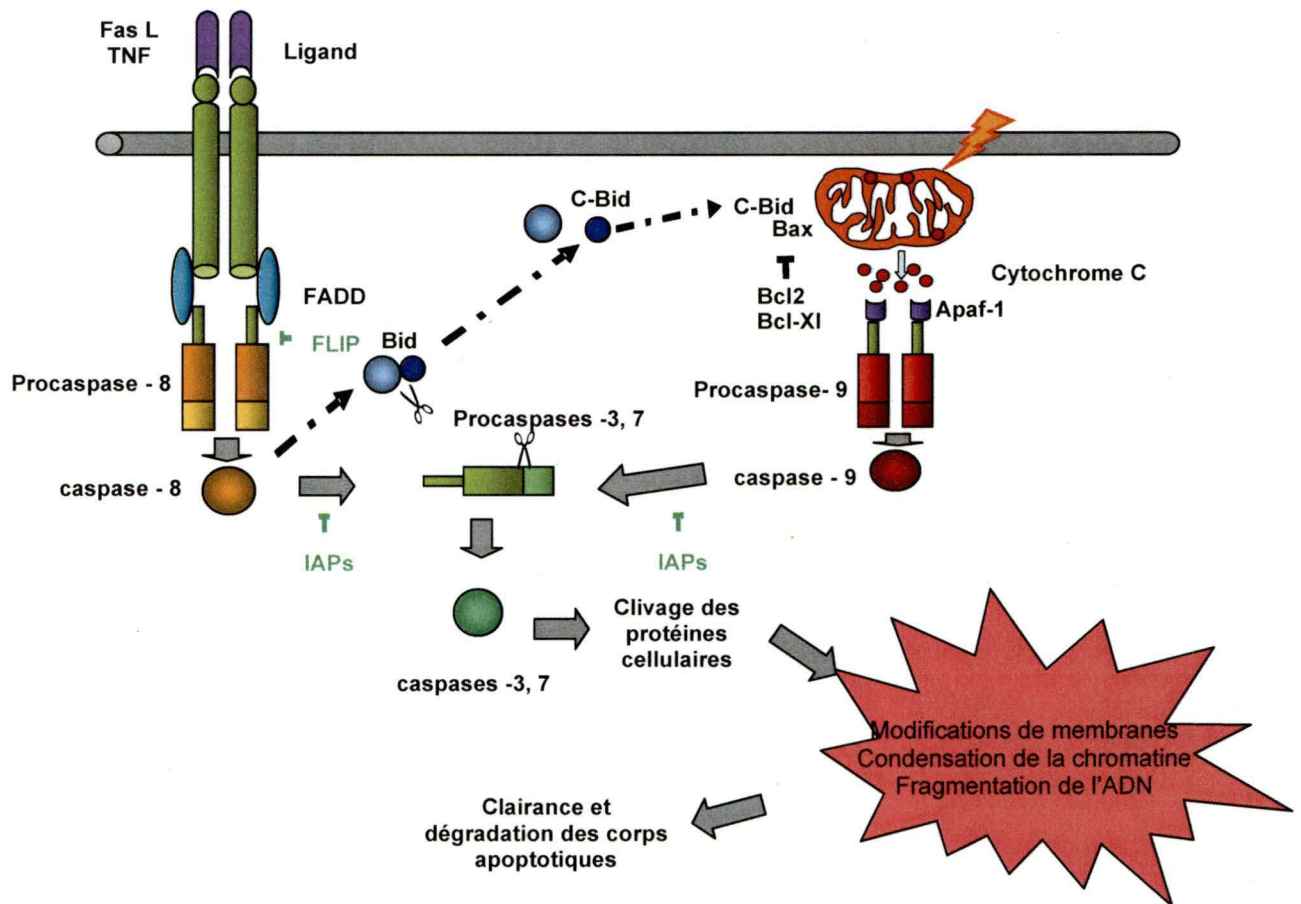


Figure 3 : Les deux principales voies d'apoptose (Hildeman, D. A. et al. 2002b)

1.3 Le diabète de type I:

Il existe chez l'homme deux principaux types de diabète soit le diabète de type I et de type II. Le diabète de type II est souvent désigné sous les noms de « diabète non-insulinodépendant » ou « diabète de l'adulte », il est caractérisé par le fait que l'organisme devient résistant à l'insuline.

Le diabète de type I également nommé « diabète insulino-dépendant » (DID) ou « diabète juvénile » apparaît lorsque le pancréas ne produit plus d'insuline. C'est une maladie auto-immune qui résulte d'une infiltration inflammatoire des îlots de Langerhans du pancréas par les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules NK. Cette phénomène entraîne la destruction sélective des cellules β productrices d'insuline. Les signes cliniques associés à la maladie sont la polyurie, une perte de poids, la polydipsie, la glucosurie, l'hyperglycémie et l'hypoinsulinémie. Cependant le DID peut apparaître chez des individus qui souffrent de d'autres maladies auto-immunes de l'intestin et de la thyroïde.

Le DID est une maladie dépendante des cellules T, et est fortement associée aux molécules du CMH. Plusieurs facteurs influencent la susceptibilité à la maladie dont les facteurs génétiques et environnementaux. Chez l'homme, plusieurs gènes de susceptibilité à la maladie ont été identifiés dont le locus IDDM1 sur le chromosome 6 qui code pour les molécules du CMH de classe II (Buzzetti, R. et al. 1998). D'autres loci en dehors du système CMH comme IDDM2 sur le chromosome 11 et IDDM12 sur le chromosome 2 contribuent à la maladie. Le gène de l'insuline dans le locus IDDM2 tient une part prépondérante et contribue à 10% de la susceptibilité de la maladie, ce qui en fait le deuxième locus de prédisposition (Bennett, S. T. et al. 1996). Les déterminants environnementaux, chez les personnes à risques, sont les agents infectieux, les facteurs nutritionnels, et les toxines (Ellis, T. M. et al. 1996; Knip, M. et al. 1999).

Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour l'étude du DID (Mordes, J. P. et al. 2004). Les souris et les rats ont été les plus étudiés. Les souris non obèses diabétiques (NOD), chez qui a été décrit le profil immunologique et 27 loci génétiques dans l'implication de la maladie ont été les plus étudiées (Serreze, D. V. et al. 2001). Cependant, le modèle souris NOD s'est révélé décevant. Les interventions immunomodulatrices autres que l'immunosuppression systémique réalisées chez ces souris préviennent le diabète (Atkinson, M. A. et al. 1999), ce qui n'est pas le cas chez l'homme (Allen, H. F. et al. 1999). De plus, contrairement à l'humain où les deux sexes sont atteints de façon égale, les femelles sont plus atteintes par rapport aux mâles chez la souris NOD; d'où l'intérêt grandissant vers d'autres modèles. La souche de rat la plus étudiée est le rat BB (Biobreeding) qui développe de façon spontanée le diabète auto-

immun dans des conditions sans infection virale comme la souris NOD. Chez le rat BB, au moins six loci ont été cartographiés, et deux locus majeurs dont le CMH et *Lyp* sont impliqués dans le développement du DID. Récemment, les rats KDP (Komeda diabetes-prone) ont été établis à partir des rats TETL (Long-Evans Tokushima Lean) (Kawano, K. et al. 1991). Cette souche développe spontanément le DID avec absence de la lymphopénie des cellules T et les deux sexes sont affectés de façon égale. Dans ce modèle, le développement du DID est régulé principalement par deux gènes dont l'haplotype u du système de CMH de classe II (Yokoi, N. et al. 2003) et le gène *Cblb* (Casitas B-lineage lymphoma b) du locus *Iddm/kdp1* (Yokoi, N. et al. 1997). La molécule adaptatrice *Cblb* est un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T. Ainsi, les souris déficientes en *Cblb* ont des fréquences plus élevées de maladies auto-immunes (Bachmaier, K. et al. 2000).

1.4 Model du rat BBDP

Le rat BB dérive de la colonie Canadienne de rats wistar (Chappel, C. I. et al. 1983). L'hyperglycémie et l'acidocétose sont apparus spontanément chez cette lignée non consanguine en 1970. A partir de ces animaux affectés, deux colonies ont été isolées pour établir les autres colonies de BB rat. La souche BBDP/Wor qui est une lignée consanguine (Worcester diabetes-prones BB rats), a été établit à Worcester au Massachusetts (USA). La seconde colonie, le rat BBdp d'Ottawa (Canada) est une lignée non consanguine. Les sous-souches du rat BB constituant les colonies tertiaires comme BB/OK, BB/Pfd et BB.SHR ont des profils immunologiques et génétiques distincts (Prins, J. B. et al. 1991).

1.4.1- Physiopathologie du diabète chez le rat BBDP

Le rat BBDP développe de façon spontanée le diabète auto-immun et insulino-dépendant. Ce syndrome diabétique est très similaire à celui observé chez l'homme et la souris NOD (Parfrey, N. A. et al. 1989).

Dans des conditions spécifiques sans infection virale, le taux d'incidence du diabète est supérieur à 93% et les deux sexes sont affectés de façon égale.

L'apparition du diabète est brusque, entre le 60 et 120 ième jour après la naissance. La maladie est caractérisée par l'hyperglycémie, l'hypoinsulinémie, la perte de poids et la cétonurie. Ces signes cliniques et métaboliques sont précédés d'une déformation histologique des îlots de Langerhans du pancréas. On note une augmentation précoce de l'expression de l'interféron (INF)- α et les molécules du CMH de classe I (Hananberg, H. et al. 1989). Il s'ensuit une infiltration progressive des îlots par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T CD4+, CD8+ , les cellules NK (natural killer) et les cellules B (Hananberg, H. et al. 1989).

L'insulite chez le rat BBDP est similaire à celui observé chez l'homme avec une prédominance des lymphocytes de type Th1 (T helper 1). Le profil cytokinique est l'augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires comme l'interféron γ et la synthétase de l'oxyde nitrique inducible (iNOS), associé à une diminution de l'expression de l'interleukine 10 (IL-10) et du TGF β (transforming grown factor β) (Kolb, H. et al. 1996). L'insulite persiste jusqu'à la destruction complète et sélective des cellules β des îlots pancréatiques.

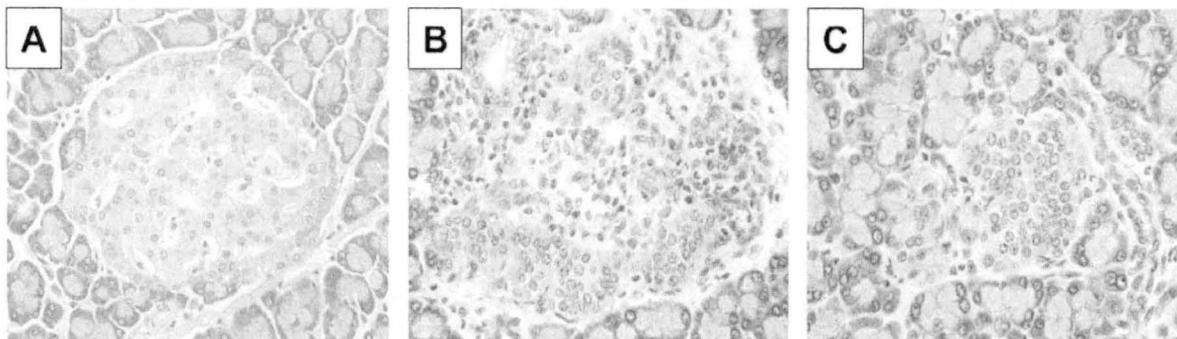


Figure 4 : Structure histologique des îlots de Langerhans du pancréas au cours du diabète de type I chez le rat.

Image des cellules pancréatiques chez un rat normale (A), un rat diabétique avec infiltration des îlots de Langerhans du pancréas (B) et un rat avec insulite en phase terminale (C) (Mordes, J. P. et al. 2004).

1.4.2 Les gènes de susceptibilité au diabète de type I

Plusieurs gènes contribuent au développement du diabète chez le rat BB-DP (Colle, E. et al. 1981; Jacob, H. J. et al. 1992). Deux loci *iddm* ont été identifiés, le locus *iddm1* et *iddm2*.

Le système CMH du rat appelé *RT1*, comprend deux locus de classe I, A et C et deux locus de classe II en déséquilibre de liaison, désignés par *B/D* (Gunther, E. et al. 2001). Chez la souche BB rat, la région *RT1 B/D* est appelée *Iddm1* et l'expression du diabète nécessite au moins la présence d'un allèle de classe II *RT1 B/D^u* (Colle, E. 1990; Fuks, A. et al. 1990). Le locus *Iddm1* est situé sur le chromosome 20.

Le locus *Iddm2* contient le gène *lyp* sur le chromosome 4. Le gène *lyp*, aussi appelé *gimap5/lrod/lan5/lan4l1* a été identifié par deux groupes de chercheurs par clonage positionnel (Hornum, L. et al. 2002; MacMurray, A. J. et al. 2002). L'homozygotie de la mutation *lyp* chez le rat BB entraîne la lymphopénie sévère et le DID.

1.4.3 Le phénotype de la mutation *lyp*

La problématique de l'immunopathologie la plus importante chez la souche de rats BB est la lymphopénie sévère (Elder, M. E. et al. 1983; Yale, J. F. et al. 1985). Il en résulte une réduction sévère du nombre de cellules T CD4⁺ et une absence quasi totale des cellules T CD8⁺ (Jackson, R. et al. 1983). La lymphopénie elle-même ne confère pas l'auto-immunité chez le rat BB-DP (Joseph, S. et al. 1993), mais le diabète spontané chez ces rats est caractérisé par un état lymphopénique avec destruction des îlots pancréatiques par les quelques lymphocytes survivants et autoréactifs (Awata, T. et al. 1995).

Dans le thymus des rats BB-DP, le développement des thymocytes est affecté au stade tardif. La mutation de *rGIMAP5* altère la transition des thymocytes DP en thymocytes simples positifs avec une augmentation du taux apoptotique des thymocytes simples positifs et des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Hernandez-Hoyos, G. et al. 1999; Ramanathan, S. et al. 1998).

A la périphérie, l'homozygotie de la mutation *lyp* du rat BB entraîne une réduction de 5 à 10 fois du nombre de cellules T CD4⁺, TCRαβ⁺ et une absence virtuelle des cellules T CD8⁺, TCRαβ⁺ (Ramanathan, S. et al. 2001; Woda, B. A. et al. 1986). Les rats BBDP présentent une déficience en cellules T, TCRγδ⁺ spléniques et intraépithéliales de l'intestin (Ramanathan, S. et al. 2002). Le nombre et la fonction des cellules NK intraépithéliales sont également affectés. L'activité cytotoxique et la production d'IL-4 et de l'interféron γ (INFγ) de ces cellules sont altérées (Todd, D. J. et al. 2004). L'un des mécanismes par lesquels la mutation de *rGIMAP5* contribuerait au diabète chez le rat BBDP est l'altération du développement post-thymique des cellules T régulatrices exprimant la protéine ART2 (ADP-ribosyltransferase) (Bortell, R. et al. 1999). Les thymocytes matures simples positifs et les lymphocytes T périphériques *rGIMAP5*^{-/-} entrent dans un état d'activation partielle qui précède l'apoptose (Lang, J. A. et al. 2004). Cet état d'activation intrinsèque aux cellules T est caractérisé par une régulation à la baisse de CD62L (L-selectine), une augmentation de l'expression de CD25 et OX-40 et une augmentation de la taille des cellules. Par contre, chez les lymphocytes B *rGIMAP5*^{-/-}, ce phénotype d'activation n'est pas observé.

L'équilibre de la population de cellules Th1-Th2 est affecté par la mutation de *rGIMAP5* chez la souche de rat PVG de fond génétique RT1^u. Ces rats déficients en *GIMAP5* développent une inflammation intestinale spontanée accompagnée d'une infiltration des éosinophiles et une réponse de type Th2 avec de haut niveau d'expression d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et une augmentation de la production des IgE sériques (Cousins, L. et al. 2006). Malgré qu'un rapport initial a montré que le gène *GIMAP5* n'est pas directement lié au diabète de type I chez l'humain (Payne, F. et al. 2004), il a été montré que les polymorphismes alléliques dans les régions codantes de *hGIMAP5* sont liés au lupus érythémateux systémique et au diabète de type I (Hellquist, A. et al. 2007; Shin, J. H. et al. 2007).

1.5 Les protéines de la famille GIMAP

1.5.1 Caractéristiques des protéines de la famille GIMAP

Les protéines liant le GTP ou les GTPases sont exprimées de façon ubiquitaire et régulent plusieurs processus dans les cellules. Les gènes *GIMAP/IAN* codent pour une nouvelle famille de protéines de 30-80 kDa avec des motifs liant le GTP. Ces protéines sont spécifiques aux vertébrés et aux plantes angiospermes et absentes chez les invertébrés et les microorganismes (Poirier, G. M. et al. 1999).

Le gène prototype des plantes a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* et est désigné AIG1 (avrRpt2-induced gene) (Reuber, T. L. et al. 1996). Le gène AIG1 contenant le motif liant le GTP, est composé de cinq motifs G (G1-G5) et d'un motif conservé (CB : conserved box) localisé entre G4 et G5 (Krucken, J. et al. 2005). La distance entre les motifs G est plus longue et l'affinité pour le GTP/GDP est 10-100 fois inférieure à celle des protéines classiques liant le GTP. L'expression de AIG1 est associée à une protection contre l'infection induite par la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* chez la plante. Cette réponse immune est caractérisée par une mort cellulaire programmée dans le site de l'infection. En plus ces protéines GIMAP portent dans leur séquence un domaine de liaison au GDP/GTP pouvant dans certains cas hydrolyser le GTP (Cambot, M. et al. 2002; Stamm, O. et al. 2002), un domaine superenroulé participant aux interactions protéine-protéine et un domaine C-terminal transmembranaire pour la localisation de certaines protéines GIMAP dans des organelles (Daheron, L. et al. 2001; Sandal, T. et al. 2003; Zenz, T. et al. 2004).

1.5.2 Nomenclature des protéines de la famille GIMAP

Plusieurs nomenclatures de ces protéines ont été proposées suivant leur découverte par différents chercheurs. Pour lever des confusions, la nomenclature retenue est celle de GIMAP (Tableau I). Les protéines GIMAP ont été mieux caractérisées chez la souris et l'homme par rapport au rat.

Chez l'homme, ces gènes sont localisés sur le chromosome 7 dans une région de 300 kb, chez la souris sur le chromosome 6 dans une région de 120 kb et chez le rat

sur le chromosome 4. Chez la souris, les protéines GIMAP sont fortement exprimées dans les cellules T et B par rapport aux cellules lymphoïdes (Nitta, T. et al. 2006a; Schnell, S. et al. 2006). Chez l'homme leur expression est plus élevée dans les tissus du système immunitaire (Krucken, J. et al. 2004; Sandal, T. et al. 2003). Ces protéines semblent jouer un rôle important dans le développement, la sélection et l'homéostasie des lymphocytes T.

Chez la souris, la protéine GIMAP1 (IAN2) est surtout exprimée dans les thymocytes DP (Nitta, T. et al. 2006a). Son expression est de beaucoup augmentée dans la rate après infection expérimentale du parasite de la malaria (Krucken, J. et al. 1999). Cette protéine a été localisée dans le réticulum endoplasmique avec liaison du GTP chez la souris, cependant cette activité de liaison au GTP est absente chez l'homme (Stamm, O. et al. 2002). La protéine GIMAP3 (IAN4), absente chez le rat, est un pseudogène chez l'homme. Chez la souris son expression est augmentée lors de la sélection positive des thymocytes. La répression de GIMAP3 entraîne une réduction des thymocytes simple positifs CD4⁺ et CD8⁺ avec accumulation des thymocytes DP (Nitta, T. et al. 2006a). Son expression est induite par l'oncoprotéine BCR/ABL, d'où son implication dans le développement de la leucémie dans le modèle murin (Daheron, L. et al. 2001). GIMAP3 liant les protéines de la famille Bcl-2, a été localisée dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et la mitochondrie. La protéine GIMAP4 (IAN1), dont l'expression est augmentée durant la sélection positive des thymocytes chez la souris, ne semble pas avoir d'effet durant le développement des thymocytes (Nitta, T. et al. 2006a). Cependant, les cellules T périphériques déficientes en GIMAP4 meurent tardivement par la mort cellulaire induite par le retrait du sérum, l'irradiation γ , l'étoposide et la dexaméthasone (Schnell, S. et al. 2006). De plus, sa surexpression dans la culture d'organe fœtal du thymus entraîne l'apoptose sévère des thymocytes DP. GIMAP4 doit promouvoir la sélection négative des cellules T autoréactives via le signal du TCR. L'expression de GIMAP4 est inversement corrélée à celle de Tal-1, un facteur de transcription impliqué dans la leucémie lymphoblastique aigue des cellules T. La protéine GIMAP4 lie et hydrolyse le GTP (Cambot, M. et al. 2002). En plus elle se lie à Bax, à la calmoduline et est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC). Elle est localisée dans le cytoplasme, l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique

(Krucken, J. et al. 2004). GIMAP8 (IAN9) contenant trois domaines AIG1, est capable d'inhiber l'apoptose induite par l'anisomycine en atténuant l'activation de la caspase-3 (Krucken, J. et al. 2005). GIMAP8 a été localisé dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et la mitochondrie. La protéine GIMAP8, exprimée dans le thymus, la rate et dans les cellules T chez le rat a été cloné par Dion (Dion, C. et al. 2005).

Tableau I : Nomenclature et fonctions des protéines GIMAP

Nomenclature GIMAP	Homme	Souris	Rat	Fonctions biologiques
GIMAP1	himap1 hIAN2	iap38, imap38 mIAN2	rIAN2	Non déterminées
GIMAP2	himap2 hIAN12	Absent	Absent	Non déterminées
GIMAP3	hIAN4 (pseudogène)	mIAN4	Absent	Sélection positive des cellules T
GIMAP4	himap4 FLJ11110 hIAN1 MSTP062	mIAN1	rIAN1	Accélération de l'apoptose Régulation du cycle cellulaire
GIMAP5	himap3 hIAN5 Irod FLJ11296	mIAN5	rIAN5	Inhibition de l'apoptose Génération des thymocytes DP Régulation du signal du TCR
GIMAP6	hIAN6, hIAN2	mIAN6	rIAN6	Non déterminées
GIMAP7	hIAN7	mIAN7	rIAN7	Non déterminées
GIMAP8	hIAN9, 10,11	mIAN9, 10,11	rIAN9,10,11	Inhibition de l'apoptose
GIMAP9	Absent	mIAN3	rIAN3	Non déterminées
GIMAP10	Absent	mIAN8 (pseudogène)	pseudogène	Non déterminées

(Dion, C. et al. 2005; Krucken, J. et al. 2004; Nitta, T. et al. 2006b)

1.5.3 GIMAP5 chez l'homme (hGIMAP5)

Le gène *hGIMAP5* ou *lan5/irod* (inhibitor of radiation and okadaic acid induced apoptosis) est situé sur le chromosome 7. La structure du gène comprend trois exons, le deuxième et le troisième exon codant pour la protéine hGIMAP5 de 35 kDa avec 308 acides aminés ayant une structure similaire à celle de rGIMAP5 (MacMurray, A. J. et al. 2002).

L'étude de l'expression de l'ARNm a montré que hGIMAP5 est exprimé dans les cellules du système immunitaire au niveau du thymus de la rate et des ganglions lymphatiques, mais aussi dans les cellules non immunes au niveau du rein, du cœur, du muscle squelettique, du foie, des intestins et du placenta (Sandal, T. et al. 2003). hGIMAP5 est exprimé sur les cellules T périphériques CD4⁺ et CD8⁺, sur les monocytes, mais pas sur les cellules B normales. Cependant des hauts niveaux d'expression ont été observés dans les lymphomes à cellules B (Zenz, T. et al. 2004). Si la localisation subcellulaire a permis d'identifier la protéine dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le centrosome (Sandal, T. et al. 2003), d'autres études ont par contre localisé la protéine dans la mitochondrie (Zenz, T. et al. 2004). La localisation à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique est médiée par la partie C-terminale, alors que la protéine reste toujours associée au centrosome après délétion de la partie C-terminale.

La fonction cellulaire de hGIMAP5 dans les cellules immunitaires et non immunes est son action anti-apoptotique. Elle inhibe l'apoptose induite par l'acide okadaïque et l'irradiation γ en amont de l'activation de la caspase-3 (Sandal, T. et al. 2003). Ces deux stimuli induisent l'apoptose par la voie dépendante de la CaMKII (Calmoduline dépendante de la protéine kinase II). L'induction de la CaMKII est sous la dépendance de la libération du calcium intracellulaire. Par contre hGIMAP5 n'a pas d'effet anti-apoptotique vis-à-vis de Fas (anti-CD95) et du TNF- α . hGIMAP5 et les protéines de la famille Bcl2 régulent l'apoptose par des voies distinctes. Ces dernières inhibent l'apoptose induite par l'étoposide, la staurosporine et la lumière UV (Strasser, A. et al. 1995) alors que hGIMAP5 n'induisait pas de protection face à ces stimuli (Sandal, T. et

al. 2003). L'étude de la relation structure-activité a montré que l'action anti-apoptotique de hGIMAP5 est médié par sa région centrale contenant le domaine superenroulé.

1.5.4- GIMAP5 chez la souris (mGIMAP5)

Chez la souris l'expression de mGIMAP5 est beaucoup plus marquée dans la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons, le thymus et la moelle osseuse. Dans la rate, mGIMAP5 est beaucoup plus exprimé dans les cellules de la lignée lymphoïde dont les lymphocytes T CD4+, CD8+ et les cellules B par rapport aux cellules de la lignée myéloïde, et son expression est beaucoup plus élevée dans les cellules T par rapport aux cellules B (Nitta, T. et al. 2006a). Dans les thymocytes, son expression augmentant avec la sélection positive, mGIMAP5 est plus exprimé sur les thymocytes DP par rapport aux thymocytes DN.

mGIMAP5 joue un rôle important dans la régulation du développement des lymphocytes avec une expression augmentée au cours de la maturation des thymocytes DP (doubles positifs) en thymocytes SP (simples positifs) (Nitta, T. et al. 2006a). La perte de mGIMAP5, par la technique d'interférence de l'ARNm, diminue considérablement la fréquence des thymocytes DP et CD4 SP avec une sensibilité accrue à l'apoptose des lymphocytes T, associée à la perte du potentiel de la membrane mitochondriale. Cependant la surexpression de Bcl-xL restaure la survie de ces cellules T déficientes en mGIMAP5. mGIMAP5 régule le développement des lymphocyte T en association avec les protéines de la famille Bcl-2, notamment les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. L'étude de la localisation subcellulaire a montré que mGIMAP5 est localisé dans les fractions de la membrane intracellulaire contenant la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, en concordance avec la localisation de Bcl-2 et Bcl-xL (Nitta, T. et al. 2006a).

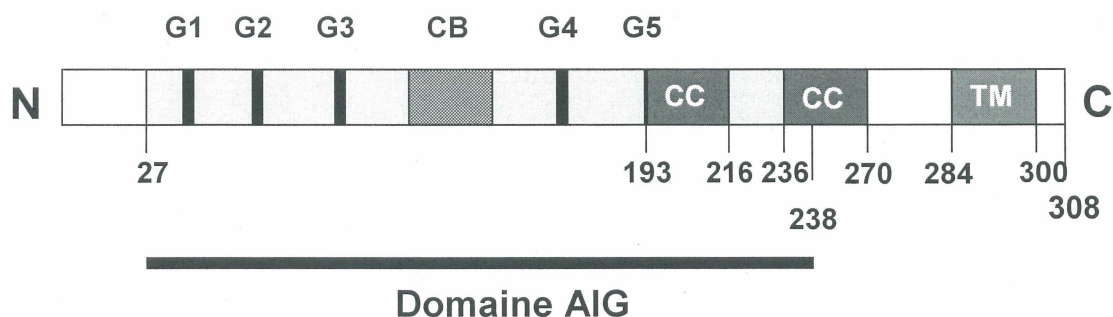


Figure 5 : Structure de mGIMAP5

Le domaine AIG (avrRpt2-induced gene) comprend cinq motifs G (G1-G5), la boîte CB (conserved box), deux domaines superenroulés ou CC (coiled-coil) et un domaine transmembranaire (TM) à la partie C-terminale.

Adapté de Krucken et al., 2005

1.5.5- GIMAP5 chez le rat (rGIMAP5)

1.5.5.1- Structure de rGIMAP5

Le locus *lddm/lyp* lié à la lymphopénie des lymphocytes T périphériques a été cartographié par clonage positionnel sur le chromosome 4 du rat sur une distance de 0,4 cM. Le gène de la protéine de rGIMAP5 possède trois exons (Hornum, L. et al. 2002; MacMurray, A. J. et al. 2002). Le premier exon (220 pb) et le deuxième exon (49 pb) sont courts, alors que le troisième exon plus grand comporte 1047 pb. L'exon 1 et 2 sont séparés par un intron de 3895 pb, l'exon 2 et 3 sont séparés par un intron de 1457 pb. L'exon 2 contient le site majeur de démarrage du cadre de lecture ouverte. L'exon 1 n'est pas traduit en protéine. Sept isoformes d'ARNm qui codent deux différentes protéines de 308 et 326 acides aminés, identiques dans les derniers 295 acides aminés, ont été détectées (Andersen, U. N. et al. 2004). La protéine rGIMAP5 de 35 kDa est composée de 308 acides aminés et présente respectivement 80% et 52% d'identité avec mGIMAP5 et hGIMAP5 (Daheron, L. et al. 2001; Stamm, O. et al. 2002). La séquence protéique de rGIMAP5 est composée d'un domaine N-terminal (acides

aminés :1-32), un domaine liant le GTP (33-84), un domaine superenroulé (200-263) et un domaine C-terminal transmembranaire (282-305).

Le dysfonctionnement de la protéine GIMAP5 chez le rat BBDP est dû à une mutation de décalage de phase de lecture par la délétion de la cystéine en position 478 dans l'exon 3. Il en résulte une protéine tronquée de 11 kDa comprenant 104 acides aminés avec perte de la région transmembranaire et du domaine superenroulé et ajout de 19 autres acides aminés avant le codon de terminaison prématuré.

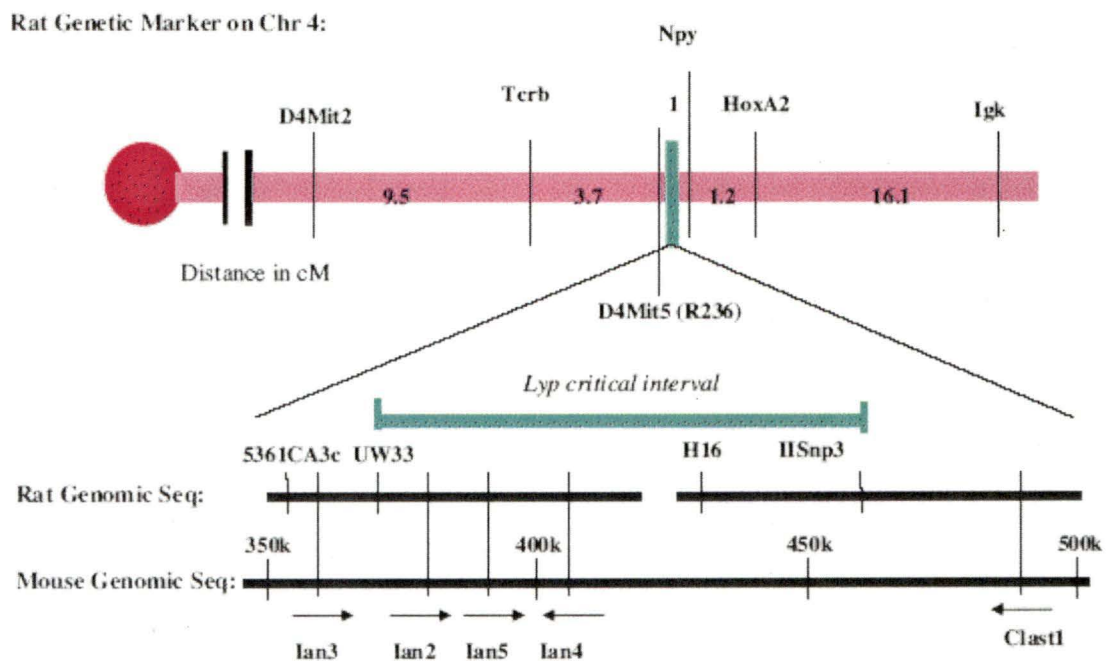


Figure 6 : Locus des protéines GIMAP chez le rat

Illustration de la localisation du locus des protéines GIMAP sur le chromosome 4 du rat. (MacMurray et al, 2002 ; Hornum et al, 2002)

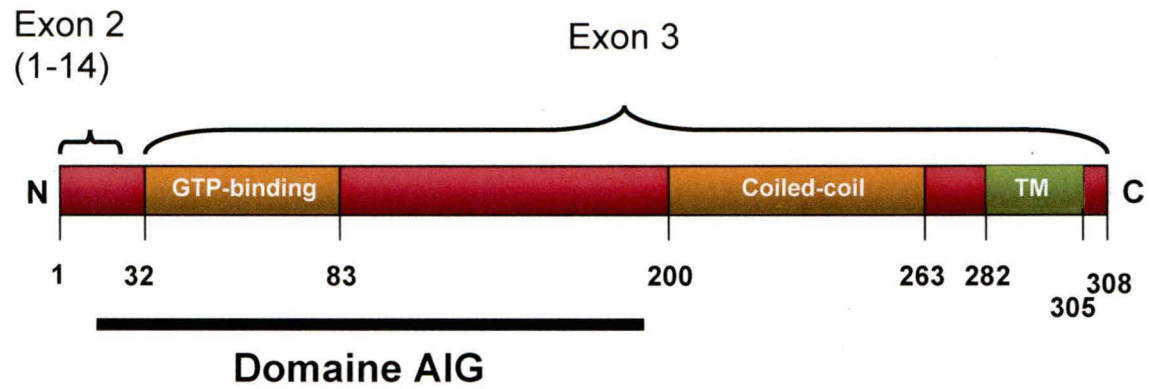


Figure 7 : Structure de rGIMAP5

Adapté de Hornum et al., 2002; MacMurray et al., 2002

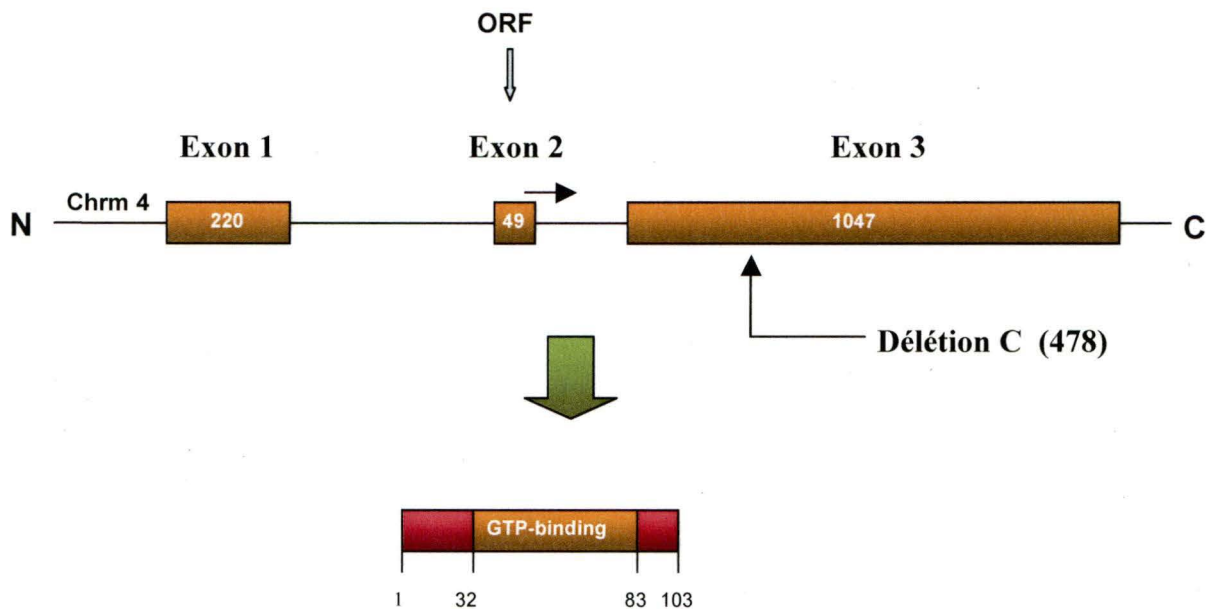


Figure 8 : Structure troquée de la protéine rGIMAP5 résultant de la mutation lyp.

Adapté de Hornum et al., 2002; MacMurray et al., 2002

1.5.5.2 Localisation tissulaire et expression de rGIMAP5

rGIMAP5 est exprimée dans les thymocytes, les cellules T et B des ganglions lymphatiques avec localisation mitochondriale (Pandarpurkar, M. et al. 2003). Les transcrits de rGIMAP5 sont exprimés dans les thymocytes DP. Cette expression est maximale dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ périphériques et absente dans les lymphocytes B, (Dion, C. et al. 2005).

1.5.5.3 Fonctions de rGIMAP5

rGIMAP5 joue un rôle important dans la régulation de la survie des cellules T et l'auto-immunité. L'apoptose causée par la mutation de rGIMAP5 est indépendante des caspases et est associée à la perte du potentiel de la membrane mitochondriale (Pandarpurkar, M. et al. 2003). Les cellules T présentant la protéine rGIMAP5 mutée ont une activité mitotique très élevée par rapport aux cellules normales (Ramanathan, S. et al. 1998). Chez le rat BBDP, la protéine tronquée a perdu le domaine transmembranaire et le domaine super-enroulé, cette dernière étant nécessaire à la fonction anti-apoptotique (Sandal, T. et al. 2003). Malgré que les voies apoptotiques affectées par GIMAP5 ne sont pas connues, il a été démontré qu'elle inhibe l'apoptose induite par l'acide okadaïque et l'irradiation γ (Sandal, T. et al. 2003).

rGIMAP5 régule aussi l'homéostasie des cellules T. Les thymocytes matures simples positifs et les lymphocytes T périphériques rGIMAP5^{-/-} entrent dans un état d'activation partielle qui précède l'apoptose (Lang, J. A. et al. 2004). Cet état d'activation intrinsèque aux cellules T est caractérisé par une régulation à la baisse de CD62L (L-selectine), une absence d'expression de OX-40 et une augmentation de la taille des cellules. Ce phénotype d'activation incomplète dû à la perte de la fonction de rGIMAP5 est associé à la voie de signalisation conduisant à l'activation de NF- κ B via les MAP kinases (Kupfer, R. et al. 2007). Ainsi rGIMAP5 diminuerait la force de signalisation du TCR par inhibition de la voie de NF- κ B pour promouvoir la quiescence des cellules T.

2- OBJECTIF

rGIMAP5 est une protéine appartenant à une nouvelle grande famille non caractérisée de protéines liant le GTP et dont la localisation subcellulaire n'a pas été encore adressée. Il est supposé que rGIMAP5 préviendrait l'apoptose des lymphocytes T par blocage de la voie intrinsèque (Ramanathan, S. et al. 2001).

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine GIMAP5 endogène dans les lymphocytes T de rat en utilisant un antisérum anti-GIMAP5 afin d'élucider son mécanisme d'action.

3- MATERIEL ET METHODES

3.1- Les animaux

Les rats ACI.1u gimap5^{lyp/lyp}, les rats contrôles non diabétiques ACI.1u gimap5^{+/+} et les souris C57BL/6 ont été utilisés pour ces expériences. Les souris C57BL/6 ont été achetées chez Charles River au Canada. Les rats ACI.1u gimap5^{lyp/lyp} et ACI.1u gimap5^{+/+} ont été obtenus de Dr P. Poussier (Toronto, Canada). Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées d'après les lignes directrices établies par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke.

3.2- Les anticorps et les réactifs

Les anticorps polyclonaux de lapin contre myc, Bax et Bcl2 ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology Associates Inc (Birmingham, AL). L'anticorps monoclonal de souris contre myc a été purifié à partir de surnageant d'hybridomes. L'anti-rat CD3-FITC et les anticorps spécifiques aux organelles dont le réticulum endoplasmique (peptide KDEL des glycoprotéines GRP78 et 94), l'appareil de golgi (GM130), les endosomes précoces (EEA1), le cytosquelette (paxillin), le noyau (NP62), Bcl-2 et Bax ont été achetés chez BD Biosciences (Palo Alto, CA). L'anticorps monoclonal anti-actine a été acheté chez Sigma. L'anticorps polyclonal de lapin anti-rGIMAP5 a été obtenu après immunisation des lapins avec le peptide de 2-15 acides aminés de la partie N terminale de la protéine rGIMAP5 couplé à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (figure 9A). Les anticorps secondaires IgG anti-lapin, IgG anti-souris couplés à la peroxydase, l'anticorps secondaire IgG anti-chèvre couplé à la peroxydase a été acheté chez ICN. Les anticorps secondaires de lapin Alexa Fluor 488 et de souris Alexa Fluor 555, le colorant mitotracker et le TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) ont été achetés chez Molecular Probes (Oregon, USA). La cytokine recombinante IL-2 a été achetée de R&D Systems (Minneapolis, MN). Le milieu de culture DMEM, le RPMI 1640 et le sérum fœtale bovin (FBS) ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON).

3.3- Culture cellulaire

Les cellules CTLL2 (lignée de cellules T CD8⁺ de souris), EL4 dépendantes de l'IL-2 (cellules T leucémiques de souris) et les cellules HEK293T ont été mises en culture dans du RPMI 1640. En plus, le milieu de culture des cellules CTLL-2 a été supplémenté avec l'IL-2 (10 ng/ml). Les lymphocytes T primaires ont été isolés à partir des ganglions lymphatiques de la rate des rats Lewis adultes. Les lymphocytes primaires, les macrophages péritonéaux et les thymocytes de rat Lewis ont été mis en culture dans du RPMI 1640. Les splénocytes ont été stimulés avec la concanavaline A (1 µg/ml) pendant 72 heures dans du RPMI pour obtenir des cellules T activées. Les lignées cellulaires de fibroblastes Rat-2 ont été mises en culture dans du DMEM supplémenté. Le milieu de culture est constitué par le DMEM contenant 2mM L-glutamine, 1000 UI pénicilline, 1000 µg/ml de streptomycine, 1 mM Sodium pyruvate (Wisent biocenter St-Bruno, QC), 5,5 µM Beta-mercaptoethanol de Sigma (Oakville, ON) et de 5% FBS. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 95 % d'air et 5 % de CO₂.

3.4- Isolement des cellules et fractionnement cellulaire

Les lymphocytes T et B de rat et de souris, ont été purifiés par sélection positive en utilisant le système Magnetic Cell Sorting (MACS) microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) selon les instructions du fabricant, les thymocytes et les macrophages péritonéaux ont été utilisés pour le fractionnement cellulaire. Les suspensions cellulaires ont été lysées dans du tampon de sucrose (composé de 250 mM de sucrose, 20 mM d'hépes pH 7,5, 2 mM de MgCl₂ et 1mM de NaEDTA) contenant les inhibiteurs de protéases (1 mM de PMSF, 1 mM de DTT, 1 mM d'aprotinine et 1mM de leupeptine) (Annis, M. G. et al. 2001). Les cellules à une concentration de 30X10⁶ cellules par ml ont été soumises à une pression de 150 ou 300 psi dans l'appareil à cavitation d'azote (Parr Instruments Co., Moline, IL) pendant 20 min, sur la glace. Les cellules éclatent suite à la libération de la pression. La suspension cellulaire est recueillie de la chambre à bombe, puis centrifugée à 500 g pendant 2 minutes à 4°C dans la microcentrifugeuse

(Heraeus Instruments) pour récupérer le culot contenant les noyaux et les cellules non lysées. Le surnageant est collecté et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Il en résulte un culot appelé P10 contenant les mitochondries et le réticulum endoplasmique et un surnageant S10. Ce dernier est soumis à une centrifugation de 100000xg à 4°C pendant 1 h dans l'ultracentrifugeuse de type Beckman TL-100 (Beckman Coulter, USA) en utilisant le rotor TLA120.2. Le culot P100 et le surnageant S100 contenant respectivement le réticulum endoplasmique et le cytosol sont recueillis. Alternativement, la fraction S10 a été soumise au gradient discontinu de sucrose à 38%, 30% et 20%, puis centrifugé à 100 000 g pour 1h (Vidugiriene, J. et al. 1999). Pour la précipitation des protéines, 1 ml de chaque fraction a été collecté du tube du haut vers le bas et mélangé à un volume égal de 20% d'acide trichloroacétique. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à -20°C, puis 15 minutes à 4°C suivi d'une centrifugation à 15 000 g. Le culot contenant les protéines a été séché à la température de la pièce.

3.5- Immunobuvardage de type western

Pour les analyses en immunobuvardage, les culots P10 et P100 ont été résuspendus dans le tampon de sucrose utilisé pour la cavitation et 200 µl du surnageant S100 du lysat de 30 millions de cellules équivalentes ont été mélangés au tampon d'échantillon de 6X (300 mM Tris pH 6.8, 6% w/v SDS, 6 mM EDTA, 6 mM dithiothreitol). Les protéines des échantillons du gradient de sucrose, précipitées avec l'acide trichloroacétique, ont été mélangées à 30 µl de tampon d'échantillon 1X et chauffées à 100°C pendant 5 min. Les protéines ont été chargées et migrées sur un gel de polyacrylamide dénaturant. La séparation a été réalisée par SDS-PAGE, sur gel de séparation de 12% d'acrylamide et le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de PVDF (Millipore) pendant 80 minutes à 100 volts. Les membranes ont été bloquées dans une solution de blocage composée de 5% de lait (poudre de lait écrémé) dilué dans du TBS-Tween (1mM Tris HCl, 10mM NaCl, 0,01%Tween-20) pendant 1 heure avec agitation à la température de la pièce, puis incubées durant toute la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique à rGIMAP5 (1:500), ou l'anti-KDEL au réticulum endoplasmique (1:250) ou au cytochrome C spécifique aux

mitochondries (1:5 000). Suite à plusieurs lavage de 10 minutes chacun avec du TBS-0,01% Tween-20 à la température de la pièce sous agitation, les membranes sont incubées en agitation pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase (dilué dans 5% de lait-TBS tween). Après trois lavages répétés avec le TBS-Tween pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire non lié, les bandes correspondantes aux protéines ayant été liées par les anticorps ont été révélées grâce aux réactifs chimioluminescents (GE-Amersham, Piscataway, NJ) selon les directives du fabricant. Au terme de cette révélation, les membranes ont été déposées dans une cassette d'exposition et mises en contact avec un film de type *Blue XB-1* (Kodac, France) pour visualiser les bandes immunoréactives.

3.6 - RT-PCR

L'ARN total a été isolé des lymphocytes T totaux des rats normaux, en utilisant méthode d'extraction au Trizol (Invitrogen). L'ADNc a été synthétisé en utilisant les amorces oligo(dT) (Roche). La PCR a été effectuée dans un appareil PCR T-gradient PCR System (Biometra) en utilisant la *Taq* Phusion DNA polymerase (Finnzymes). Les séquences sens contenant le site de restriction de l'enzyme *EcoRI* et les séquences anti-sens contenant celui de *XhoI* des amorces (tableau II) ont été utilisées pour amplifier rGIMAP5 et N-myc-rGIMAP5.

Tableau II : Les amorces pour la RT-PCR

rGIMAP5	Sens	5'-GGAATTCCAGAAGCTGCGGTGCACTG-3'
	Anti-sens	5'-CCTCGAGTCATTTCCACCTGCCAATGT-3'
N-MycrGIMAP5	Sens	5'-GGAATTCCACCATGGAACAAAACTT-3'
	Anti-sens	5'-CCTCGAGTCATTTCCACCTGCCAATGT-3'

Tableau III : Programmation des cycles du PCR

Temperature (°C)	Temps	Cycle
98	30 secondes	35 fois
98	7 secondes	
65	30 secondes	
72	35 secondes	
72	10 minutes	

3.7- Construction du plasmide

La protéine rGIMAP5 entière et la protéine tronquée (délétion de 45 acides aminés à la partie N-terminale) étiquetées par l'épitope myc ont été préparées à partir de l'ADNc des lymphocytes T des ganglions lymphatiques de rat. Ces deux versions de rGIMAP5 ont été clonées dans le vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen). Les ADNc de la séquence codante pour rGIMAP5 et N-myc-rGIMAP5 ont été amplifiés par PCR, et digérés par *EcoRI* et *XhoI* puis clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 entre les sites d'*EcoRI* et de *XhoI*. Les plasmides recombinants ont été confirmés par séquençage de l'ADN (Université de Calgary).

Pour l'établissement des transfectants stables exprimant la protéine rGIMAP5, les fibroblastes Rat-2-rGIMAP5Nmyc ont été transfectés avec le plasmide pcDNA3.1-rGIMAP5Nmyc en utilisant la lipofectamine 2000 (Invitrogen) suivant les directives du fabricant. Après 48 heures, les transfectants stables sont mis en culture dans du DMEM supplémenté avec 600 µg/ml de l'antibiotique G418 (Promega) pour 15 jours et ensuite maintenus dans le milieu de culture contenant 300 µg/ml de G418. En parallèle, les fibroblastes Rat-2 (Rat-2 contrôle) ont été transfectés avec le vecteur pcDNA3.1 et sélectionnés par G418 pour servir de cellules contrôle.

3.8- Technique d'immunofluorescence

Les clones Rat2-rGIMAP5 étiquetés par myc et les clones Rat-2 ont été ensemencés à une densité de 2×10^5 cellules par pètri dans des pètris de 35 mm contenant les lamelles (22X22 mm). A 80% de confluence les cellules ont été lavées au PBS 1X à 37°C et fixées avec 2% de paraformaldéhyde pendant 15 min à 37°C. Les cellules ont été ensuite rincées 3 fois au PBS 1X (37°C), puis perméabilisées avec du PBS 1X contenant 0,1% de triton pendant 15 min à température ambiante. Au terme de la perméabilisation, les cellules ont été lavées au PBS 1X et le blocage réalisé avec du PBS-2% BSA (37°C) pendant 20 min. Les anticorps primaires contre myc ont été incubés pendant 2h dans du PBS-2% BSA (37°C). L'anticorps primaire polyclonal dirigé contre myc a été incubé, à une dilution de 1:300. Pour l'anticorps monoclonal myc, la dilution est de 1:3 dans du PBS-2% BSA (37°C). Après lavage avec du PBS 1X, les cellules sont incubées 1h avec l'anticorps secondaire anti-Rb-Alexa fluor 488 à une dilution de 1:5 000 dans du PBS-2%BSA (37°C) ou avec l'anti-Alexa fluor 555 (1:400) respectivement dirigés contre l'anticorps primaire polyclonal myc et l'anticorps monoclonal myc pendant 1h. Pour le marquage des différentes organelles, les anticorps primaires (tableau II) KDEL (1:500), GM130 (1:200), EEA1 (1:1000), paxillin (1:5000), Bcl2 (1:200) et Bax (1:100) ont été incubés pendant 2h. Après lavage, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 pour Bcl2 et Bax, les autres organelles avec Alexa Fluor 555. Alexa Fluor 488 apparaît en pixels vert sur l'axe X et Alexa Fluor 555 en pixels rouges sur l'axe Y.

Le marquage avec Mitotracker a été réalisé à la concentration de 500 nM pendant 1 heure à 37°C après fixation des cellules avec la solution de formaldéhyde 3,8% diluée dans du DMEM 5% durant 15 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées au PBS 1X, suivi d'une perméabilisation avec le PBS 1X-0,1% triton pendant 15 minutes à la température de la pièce au terme de laquelle les cellules ont été rincées dans du PBS 1X. Finalement, les cellules ont été montées sur des lames avec du Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame). La localisation cellulaire de rGIMAP5 dans les différentes organelles a été examinée à l'aide d'un microscope confocal à balayage

(1X81 FV1000, Olympus, Tokyo). Le traitement des images a été fait avec le logiciel FluoView Software (Olympus).

Tableau IV : Liste des anticorps primaires et colorants utilisés pour le marquage des organelles et protéines.

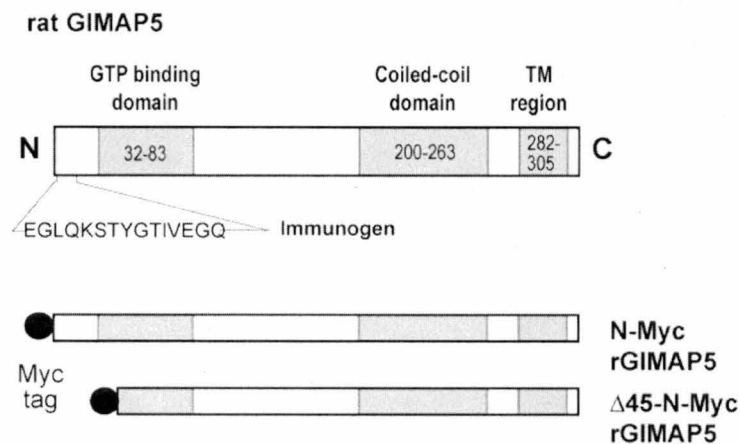
Organelle/Protéine	Anticorps/colorant	source
Réticulum endoplasmique	KDEL	souris
Mitochondrie	Mitotracker	
Appareil de golgi	GM-130	souris
Endosomes précoces	EEA1	souris
Noyaux	NP62	souris
Cytosquelette	Phalloïdine	
Jonctions serrées	Connexine-43	souris
rGIMAP5	rGIMAP5	Lapin
Bcl-2	Bcl-2	Lapin

4- RESULTATS

4.1- Génération de l'anticorps anti-GIMAP5

Plusieurs études ont utilisé la surexpression de hGIMAP5, mGIMAP5 et rGIMAP5 étiquetées dans les cellules eucaryotes pour étudier leur localisation subcellulaire et leur fonction (Dalberg, U. et al. 2007; Nitta, T. et al. 2006a; Sandal, T. et al. 2003; Zenz, T. et al. 2004). Malgré une contribution significative de ces études pour la caractérisation moléculaire de GIMAP5, ces données ne reflètent pas nécessairement celles de la protéine endogène. Puisqu'un bon anticorps contre rGIMAP5 n'est pas encore disponible pour confirmer ces données, nous avons immunisé des lapins avec un peptide composé de 14 résidus correspondant aux acides aminés 2-15 (EGLQKSTYGTIVEGQ) de la partie N-terminale de rGIMAP5 (**AY055776** : numéro d'accès du gène de la banque de données). Ce peptide n'est pas retrouvé chez les autres protéines de la famille GIMAP (figure 9A). Nous avons sous-cloné la version entière (N-Myc-GIMAP5) de rGIMAP5 et la version tronquée (Δ 45-N-Myc-GIMAP5) à laquelle manque 45 acides aminés à la partie N-terminale (figure 9A) pour éviter une interférence potentielle avec le domaine ancré à la membrane au niveau de la partie C-terminale. L'analyse par l'immunobuvardage de type western des cellules HEK293T transfectées avec les vecteurs contenant l'une des versions de rGIMAP5 a montré que l'anti-sérum de rGIMAP5 reconnaît la protéine entière et non la protéine tronquée de rGIMAP5.

A



B

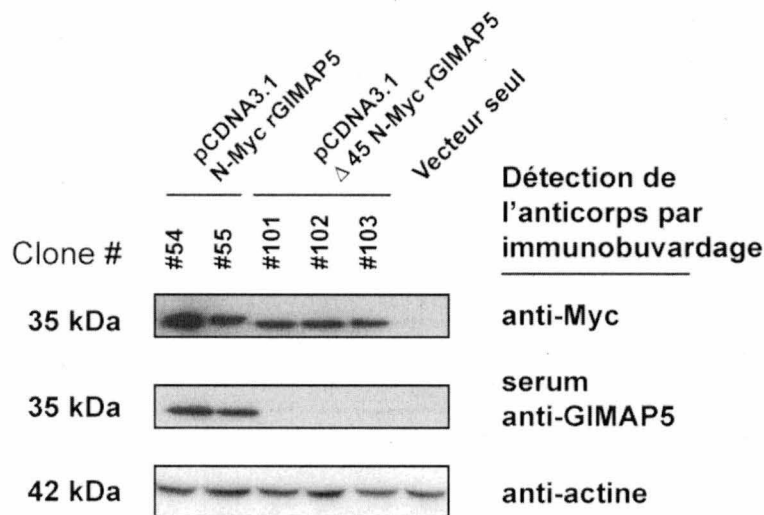


Figure 9: Reconnaissance de la protéine entière GIMAP5 et non la protéine tronquée par l'anticorps généré

A) Les lapins ont été immunisés avec le peptide immunogène de la partie N-terminale de rGIMAP5 composé de 14 acides aminées. La protéine entière et la protéine tronquée avec délétion de 45 acides aminés à la partie N-terminale ont été étiquetées par myc. B) 30×10^6 /ml de cellules HEK293T transfectées de façon transitoire avec la protéine entière rGIMAP5 (clones 54 et 55) ou la protéine tronquée (101; 102; 103) étiquetée par myc. Les cellules HEK 293T ont été lysées dans un tampon SDS, le lysat a été migré sur un gel de polyacrylamide 12%, rGIMAP5 a été révélée avec l'anticorps indiqué.

4.2- Expression de la protéine endogène rGIMAP5 dans les cellules T primaires de rat ACI.1u *gimap5*^{+/+}

Les transcrits de rGIMAP5 sont détectés dans les thymocytes immatures double positifs CD4⁺CD8⁺, les thymocytes matures simple positifs CD4⁺, CD8⁺ et les lymphocytes périphériques des ganglions lymphatiques, mais pas dans les cellules B (Dion, C. et al. 2005). Pour tester l'expression de la protéine native rGIMAP5, les lysats des cellules des ganglions lymphatiques fraîchement isolés des rats ACI.1u *gimap5*^{+/+} ont été évalués par immunobuvardage de type western. Pour cela, nous avons utilisé l'anti-sérum rGIMAP5. Nous n'avons pas pu détecter rGIMAP5 même après chargement de 5 x10⁶ cellules dans un puits (données non montrées). Comme les cellules T non stimulées fraîchement isolées possèdent des quantités de cytoplasme très faibles et que l'expression de la protéine rGIMAP5 pourrait être très faible, nous avons recouru au fractionnement subcellulaire. Nous avons lysé les cellules par la technique de la cavitation d'azote pour préserver l'architecture des organelles et centrifugé le surnageant post-nucléaire à 10 000 g pour 10 min pour obtenir les fractions du culot (P10) et du surnageant (S10). La fraction S10 a été centrifugée davantage à 100 000 g pendant 60 min pour obtenir les fractions P100 et S100 qui contiennent respectivement les organelles sédimentables et le cytosol.

L'évaluation des différentes cellules primaires de rat a montré que rGIMAP5 était détectable dans la fraction P100 des lymphocytes T mais pas dans les thymocytes, les macrophages et les cellules B (figure 10). Cependant les protéines contenant la séquence KDEL (GRP78 et GRP94) et le cytochrome C qui sont respectivement le marqueur du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie, ont été majoritairement trouvées dans les fractions P10. Ces observations indiquent que, malgré une concordance entre le profil d'expression de l'ARNm et de la protéine native rGIMAP5, la localisation subcellulaire de la protéine est en grande partie contradictoire avec la plupart des données publiées en utilisant des versions d'épitopes étiquetés de GIMAP5 de l'homme et de la souris.

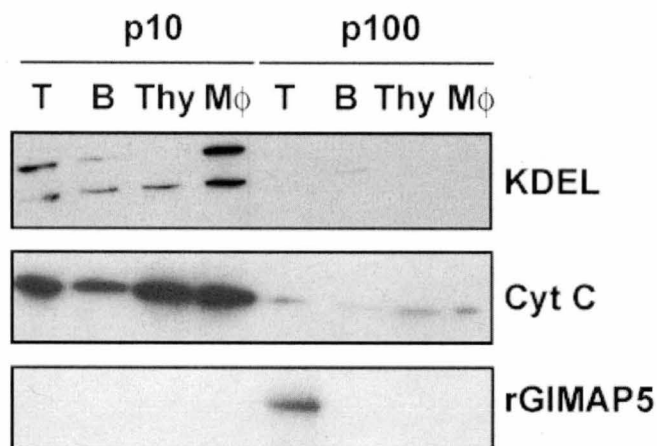


Figure 10: Expression de GIMAP5 dans les lymphocytes T de rat ACI.1u *gimap5*^{+/+}

30 x 10⁶/ml de lymphocytes T (T) ou B purifiés, de thymocytes (Thy) et de macrophages péritonéaux (mΦ) de rats WF ont été lysés par la cavitation d'azote à 300 psi pendant 20 min. Les fractions ont été recueillies par centrifugation et migrées sur un gel de polyacrylamide 12%, la protéine d'intérêt a été révélée avec l'anticorps rGIMAP5.

4.3- La distribution différentielle de rGIMAP5 dans les lymphocytes T de rat sous différentes conditions de lyse.

Nous avons déterminé la pression optimale de lyse à l'azote des cellules T primaires de rat à 300 psi en évaluant les cellules lysées par observation microscopique, la distribution des marqueurs de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique dans la fraction P10. Pour déterminer si la raison de la dissociation de rGIMAP5 des mitochondries et du réticulum endoplasmique dans nos expériences pourrait être due à la force de lyse élevée, nous avons utilisé une pression plus faible de 150 psi pour lyser les cellules. Comme indiqué dans la figure 11, la diminution de la pression d'azote a eu comme conséquence le rétablissement de la majeure partie de rGIMAP5 dans la fraction P10 où la plupart des marqueurs des mitochondries et du réticulum endoplasmique ont été trouvés. L'activation préalable des cellules T de rat par la stimulation avec l'anticorps anti-CD3 qui altère la morphologie cellulaire pendant 3

jours, n'a pas d'effet sur la distribution dépendante de la pression de rGIMAP5 dans les fractions P10 et S10.

Avec la lyse à 150 psi des cellules HEK293T surexprimant rGIMAP5, la majorité de rGIMAP5 a été trouvée dans la fraction P10, cependant une quantité significative a été retrouvée dans la fraction P100 (figure 11B). Notre anticorps anti-rGIMAP5 reconnaît aussi mGIMAP5. La lignée de cellules T cancéreuses EL4 de souris a montré une expression plus forte comparée à l'expression très faible dans les cellules CTLL-2, une lignée cytotoxique de cellules T de souris (figure 11A). Comme rGIMAP5 est retrouvée dans la fraction sédimentable avec une distribution différentielle comparée aux mitochondries ou au réticulum endoplasmique dépendamment de la pression de lyse cellulaire utilisée, nous formulons l'hypothèse que rGIMAP5 est présent dans un compartiment cellulaire distinct qui est faiblement associé avec le réticulum endoplasmique et ou la mitochondrie.

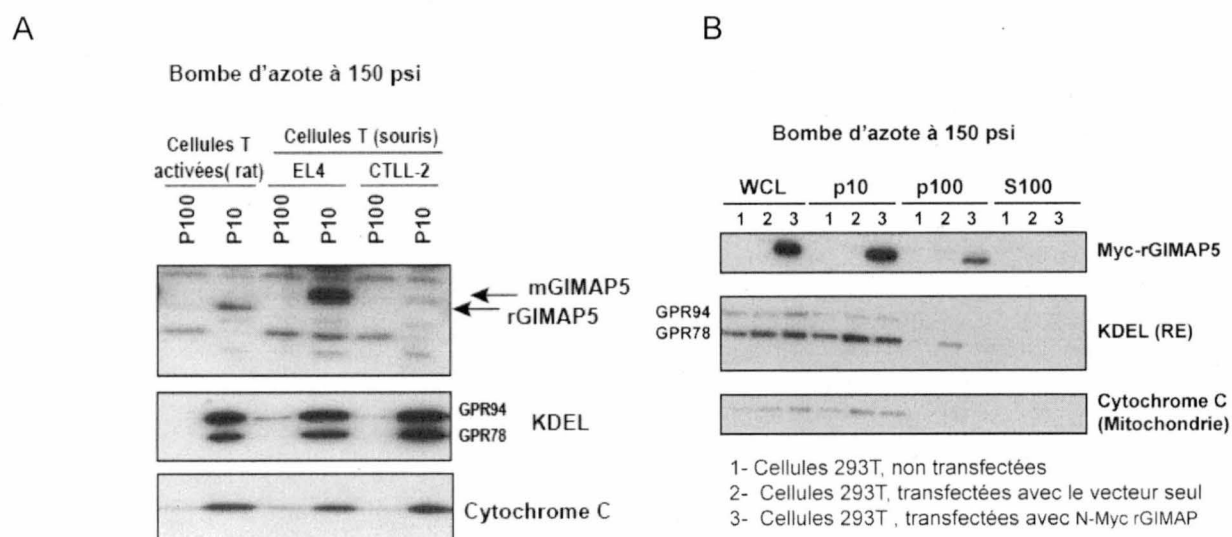


Figure 11: Co-séparation à 150 psi de rGIMAP5 dans la fraction P10 contenant la mitochondrie et le RE

A) 30×10^6 par ml de lymphocytes T activés de rats ou des cellules EL4 et CTLL2 lysées dans l'appareil à bombe d'azote à une pression de 150 psi pendant 20 min et les fractions ont été recueillies par centrifugation. B) 30×10^6 par ml de cellules 293T transfectées de façon transitoire par rGIMAP5 étiquetée avec myc ont été lysées à 150

psi pendant 20 min. Les différentes fractions ont été analysées par immunobuvardage de type western comme indiqué dans matériel et méthodes. Les protéines d'intérêt ont été révélées avec les anticorps indiqués.

4.4- rGIMAP5 est associée à un compartiment cellulaire distinct dans les cellules T primaires de rat ACI.1u *gimap5*^{+/+}.

Pour explorer davantage la localisation subcellulaire de rGIMAP5 dans les cellules T primaires de rat ACI.1u *gimap5*^{+/+}, nous avons soumis la fraction S10 du lysat obtenu par la bombe d'azote à 300 psi à une centrifugation sur gradient de sucrose discontinu. Les différentes fractions étaient analysées par immunobuvardage de type western pour la distribution de rGIMAP5 et des marqueurs des organelles. Comme indiqué sur la figure 12, les fractions contenant le cytochrome C et KDEL n'ont pas été retrouvées dans aucune fraction du gradient de sucrose, alors qu'une fraction de Bcl-2 a été retrouvée en dehors de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, et Bax a été retrouvé à travers le gradient dans le cytosol et les fractions associées à la membrane. La paxilline, un composant du cytosquelette, a été retrouvé seulement dans les fractions du cytosol et P10. rGIMAP5 n'est pas associée à aucune des fractions cytosolique ou membranaire, mais a été retrouvée exclusivement au fond du gradient de sucrose (figure 12). Cette observation suggère que rGIMAP5 n'est ni une protéine soluble, ni associée à une des fractions distinctes de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique. Cependant, il apparaît que rGIMAP5 semble associée soit à un complexe moléculaire large ou à un organelle vésiculaire de faible densité.

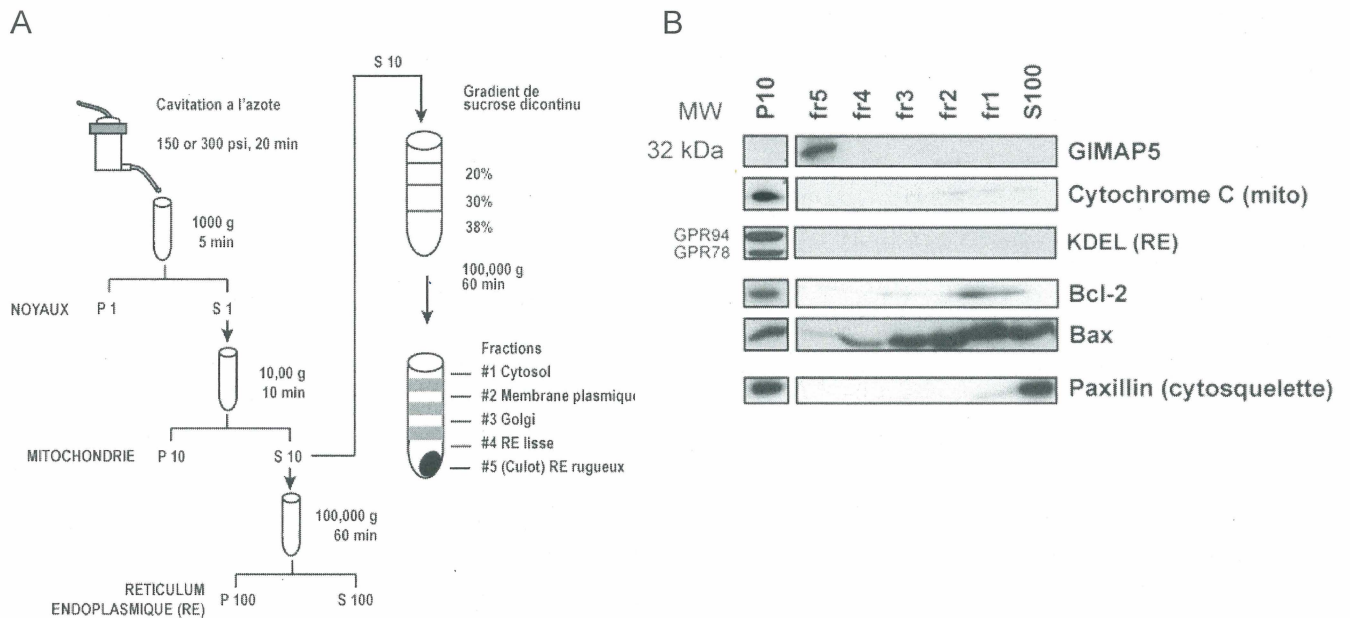


Figure 12: Expression de la protéine native rGIMAP5 dans la fraction 5 du gradient de sucrose réalisé à partir des cellules des ganglions lymphatiques de rat ACI.1u gimap5+/+.

A) Les cellules totales extraites des ganglions lymphatiques ont été soumises à la technique de fractionnement cellulaire à 300 psi tel que décrite dans la section matériel et méthodes. Dans un tube (11X34 mm) pour l'ultracentrifugeuse, le gradient a été réalisé en y mettant respectivement 360 µl de sucrose à 38%, 180 µl de sucrose à 30%, 180 µl de sucrose 20% et 280 µl du surnageant issu de la centrifugation à 10 000 g. Le tube a été centrifugé à 100 000 g pendant 1h à 4°C au terme duquel les différentes fractions ont été collectées du haut vers le bas du tube et précipitées avec l'acide trichloracétique comme indiqué dans matériel et méthode. La fraction 1 doit contenir le cytosol, la fraction 2 la membrane plasmique, la fraction 3 l'appareil de golgi, la fraction 4 le réticulum endoplasmique lisse et la fraction 5 (contenant le culot) le réticulum endoplasmique rugueux. B) Les différents lysats ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 12%, les protéines d'intérêt ont été révélées avec les anticorps indiqués.

4.5- Étude de la colocalisation de rGIMAP5 dans les organelles par microscopie confocale

L'antiserum rGIMAP5 détecte aussi certaines bandes additionnelles même dans les cellules 293T non transfectées (figure 11A). Pour cette raison, notre anticorps généré n'est pas convenable pour l'immunofluorescence et l'immunoprécipitation. Pour tester la spécificité de notre anticorps polyclonal contre la protéine native, nous avons surexprimé rGIMAP5 étiqueté par myc dans les fibroblastes Rat-2 pour voir la colocalisation dans les différentes organelles par microscopie confocale.

4.5.1- Etude de la colocalisation de GIMAP5 avec Bcl-2

Comme la plupart des protéines de la famille Bcl-2 sont associées à la mitochondrie, nous avons vérifié cette association dans notre modèle cellulaire comme contrôle positif. Nous avons marqué Bcl-2 en vert et la mitochondrie par mitotracker en rouge. Nous avons observé cette association entre Bcl2 et la mitochondrie comme indiquée sur le fluorogramme par la répartition des pixels suivant l'axe diagonale sur les figures (figure 13). Contrairement aux études qui ont montré que mGIMAP5 co-immunoprécipite avec Bcl-2 et Bcl-xL (Nitta, T. et al. 2006a), nous n'avons pas observé d'association de Bcl-2 avec GIMAP5 comme l'indique la répartition distincte des pixels suivant l'axe X et Y.

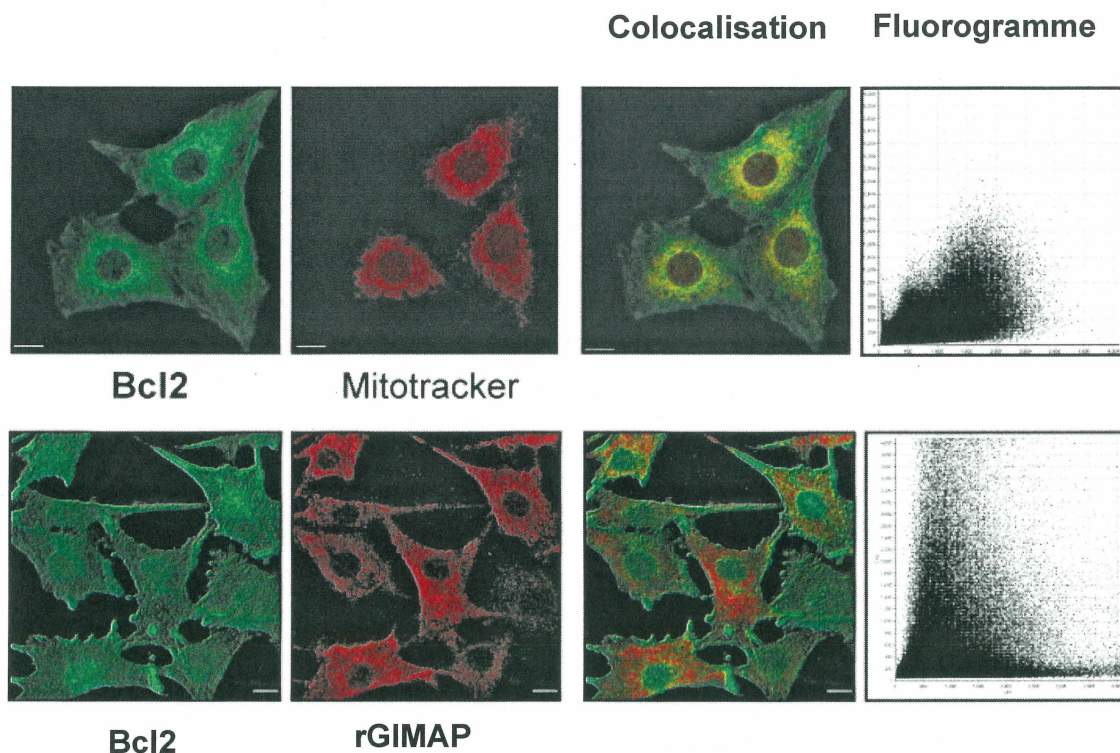


Figure 13 : Absence de colocalisation de Bcl-2 avec GIMAP5

Les fibroblastes Rat-2 transfectés de façon stable avec rGIMAP5 étiquetée par myc ont été préparés pour l'analyse par microscopie confocale selon les indications fournies dans la section matériel et méthodes. Bcl-2 est marqué en vert, la mitochondrie marquée par mitotracker et GIMAP5 sont en rouge, la figure de colocalisation montrant la superposition des images en vert et en rouge, et enfin le fluorogramme montrant la répartition des pixels.

4.5.2- Dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique

Afin de confirmer l'absence de colocalisation de rGIMAP5 avec la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique (figure 11) dans notre modèle cellulaire, nous avons effectué un marquage par immunofluorescence des cellules Rat-2 transfectées. Le colorant mitotracker qui s'accumule dans la mitochondrie permet de révéler cette

dernière. L'anticorps KDEL reconnaît la séquence KDEL sur la partie C-terminale des protéines jouant un rôle dans le repliement et l'assemblage au niveau du réticulum endoplasmique. L'analyse par microscopie confocale révèle que rGIMAP5 n'est ni exprimée dans la mitochondrie, ni dans le réticulum endoplasmique comme le montre la répartition distincte des pixels suivant l'axe X et Y sur le fluorogramme (figure 14).

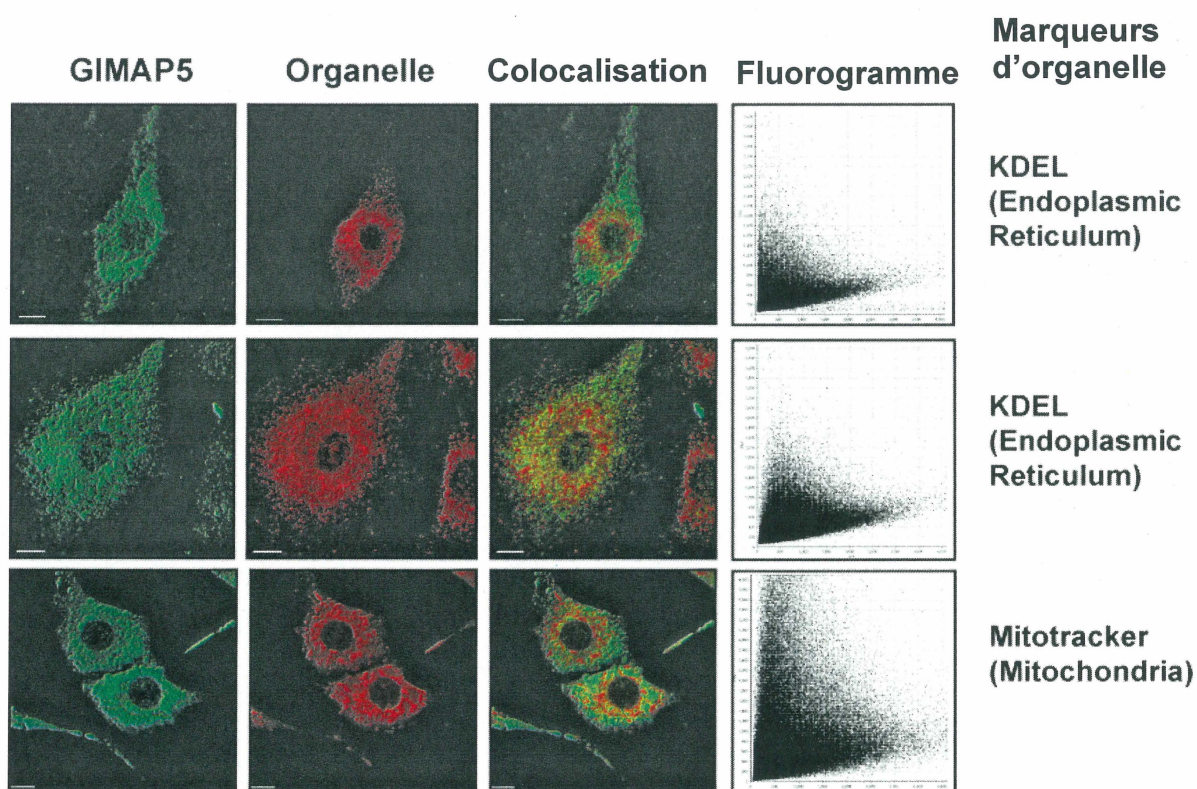


Figure 14: Absence de colocalisation de rGIMAP5 avec la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.

GIMAP5 est marqué en vert, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont respectivement marqués en rouge par les anticorps KDEL et le colorant mitotracker spécifique aux mitochondries, la figure de colocalisation et enfin le fluorogramme montrant la répartition des pixels.

4.5.3- Dans l'appareil de golgi, les endosomes précoces et le noyau

Puisqu'il a été démontré que hGIMAP5 est localisé dans l'appareil de Golgi (Sandal, T. et al. 2003), nous avons effectué un marquage par immunofluorescence de l'appareil de golgi et des endosomes respectivement par les anticorps GM130 et EEA1 pour voir si rGIMAP5 est exprimée dans ces organelles. L'anticorps GM130 (Golgi Matrix 130) reconnaît la protéine de poids moléculaire de 130 kDa de la matrice de l'appareil de golgi et est associée à la périphérie du compartiment cis. L'anticorps EEA1 (Early endosome antigen 1) est spécifique d'un antigène de 180 kDa sur les endosomes précoces. L'anticorps NP62 (Nucleoporin p62) est un marqueur de la membrane nucléaire (figure 15).

+

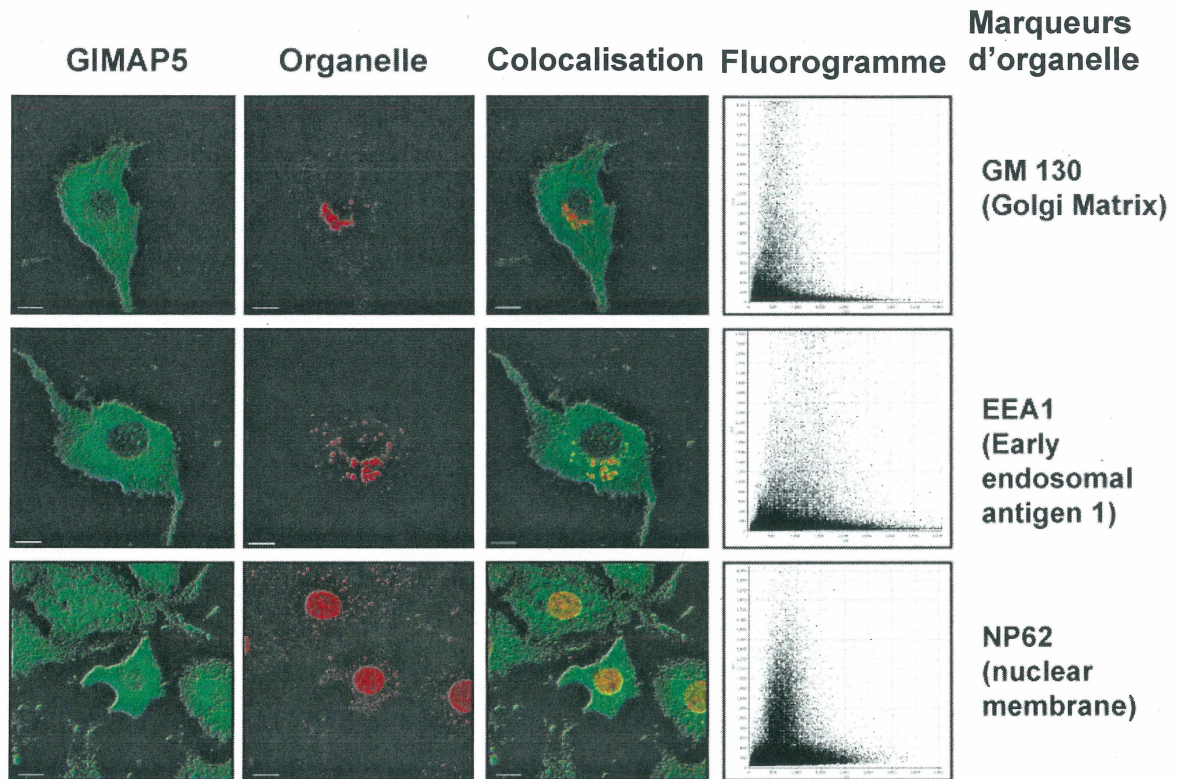


Figure 15: rGIMAP5 ne colocalise pas avec l'appareil de golgi, les endosomes précoces et le noyau.

GIMAP5 est marqué en vert, l'appareil de golgi, les endosomes précoces et les noyaux sont respectivement marqués en rouge par les anticorps GM130, EEA1 et NP62, la figure de colocalisation et enfin le fluorogramme montrant la répartition des pixels.

4.5.4- Dans le cytosquelette, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les jonctions serrées

Afin de vérifier l'expression de rGIMAP5 dans le cytosquelette, nous avons utilisé la phalloïdine comme marqueur du cytosquelette. La phalloïdine est spécifique aux filaments F de l'actine. La connexine 43 est un marqueur des jonctions serrées.

Cependant rGIMAP5 n'est pas associée à aucun de ces organelles comme le montre la répartition des pixels par le fluorogramme (figure 16).

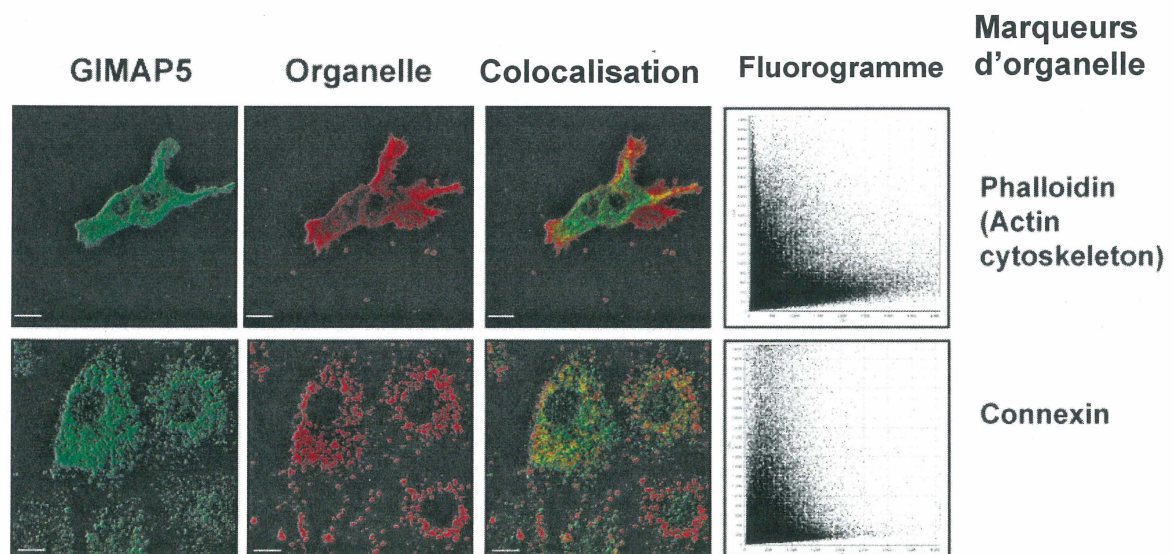


Figure 16: rGIMAP5 n'est pas exprimée dans le cytosquelette, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les jonctions serrées

GIMAP5 est marqué en vert, le cytosquelette marqué par la phalloïdine et les jonctions serrées marqués par la connexine-43 sont en rouge, la figure de colocalisation et enfin le fluorogramme montrant la répartition des pixels.

5- DISCUSSION

rGIMAP5 est une protéine appartenant à une nouvelle grande famille non caractérisée de protéines liant le GTP et qui sont associées au système immunitaire. La fonction de ces protéines est méconnue car, peu d'informations sont disponibles sur les cellules qui les expriment de même que sur leur localisation subcellulaire. L'analyse d'une variété de lignées cellulaires (Daheron, L. et al. 2001) a montré que les protéines GIMAP seraient surtout exprimées sur les cellules du système immunitaire dont les lymphocytes T ou B, les cellules dendritiques et les macrophages. Par exemple mGIMAP1 est exprimée dans les macrophages et les cellules B de la rate (Krucken, J. et al. 1997), mGIMAP4 dans le thymus, la rate, les cellules T et les macrophages (Poirier, G. M. et al. 1999) et mGIMAP3 dans la rate (Daheron, L. et al. 2001).

Chez les rats BBDP présentant une mutation de rGIMAP5, il a été observé une réduction sévère de l'ARNm de rGIMAP5 dans les ganglions lymphatiques (MacMurray, A. J. et al. 2002). Cette mutation est associée à une lymphopénie affectant les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Greiner, D. L. et al. 1997). Au cours du développement des cellules T, le phénotype associé à la mutation *lyp* se manifeste au stade des thymocytes CD4⁺ et CD8⁺ SP (Hernandez-Hoyos, G. et al. 1999; Plamondon, C. et al. 1990; Ramanathan, S. et al. 1998). Les thymocytes DP, SP et les cellules T périphériques CD4⁺ et CD8⁺ expriment l'ARN de *GIMAP5*, mais pas les cellules B et les macrophages (Dion, C. et al. 2005). En concordance, nous avons détecté la protéine dans les cellules T périphériques, mais pas dans les cellules B et les macrophages de rats. A cause des difficultés techniques d'isoler un plus grand nombre de thymocytes SP, nous n'avons pas testé cette population pour l'expression de la protéine GIMAP5. En plus, nous n'avons pas détecté la protéine dans les thymocytes totaux constitués à 90% de thymocytes DP (figure 10). Il est possible que GIMAP5 soit l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle puisque les thymocytes DP expriment les transcrits du gène.

Chez la souris, les transcrits de GIMAP5 sont détectés dans les thymocytes SP, les cellules T et B périphériques à un niveau réduit (Nitta, T. et al. 2006a). Il est possible

qu'il y ait des différences spécifiques d'espèce au niveau de l'expression et de la régulation post-transcriptionnelle de *GIMAP5*.

Chez l'humain, les transcrits de *GIMAP5* ont été détectés dans les cellules T, aussi dans les monocytes mais pas dans les cellules B (Zenz, T. et al. 2004). Cependant, les transcrits de *GIMAP5* ont été détectés dans certains lymphomes de cellules B (Zenz, T. et al. 2004). Il n'est pas connu, si la protéine *GIMAP5* est aussi exprimée dans ces cellules. *GIMAP5* étant un facteur de survie, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer son rôle possible dans le développement des tumeurs. Chez l'humain, il a été observé une association entre le polymorphisme dans les séquences dans la région non traduite 3' avec le lupus érythémateux systémique et le diabète de type I (Hellquist, A. et al. 2007; Shin, J. H. et al. 2007).

GIMAP5 appartient à une nouvelle famille de protéines avec une homologie minimale à d'autres familles de protéines. L'analyse de la comparaison de séquence n'a pas révélée aucune identification de domaines de protéines connus. Pour cela, il est difficile d'interférer la fonction ou le rôle de *GIMAP5* dans la survie des cellules T. Dans le but d'avoir un aperçu de la fonction possible de la protéine *GIMAP5*, nous avons déterminé la localisation subcellulaire de la protéine endogène.

Nos résultats d'immunobuvardage de type western indiquent une absence d'expression de la protéine native r*GIMAP5* à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique à une lyse de pression de 300 psi dans les cellules T primaires de rats normaux (figure 10). r*GIMAP5* a été retrouvée dans la fraction P100 contenant les organelles sédimentables. Par contre lorsque la lyse de pression est effectuée à 150 psi, r*GIMAP5* se co-sépare dans la même fraction (P10) avec la mitochondrie et le réticulum endoplasmique dans les cellules T primaires de rats normaux et des cellules leucémiques EL4 et CTLL-2 de souris (figure 11A). On observe également cette co-séparation dans les cellules 293T transfectées de façon transitoire par r*GIMAP5* (figure 11B). Cependant, dans ce système de surexpression, une fraction mineure de r*GIMAP5* a été observée dans P100, possiblement due à une production excessive de la protéine. Ces résultats suggèrent que r*GIMAP5* est présent dans un compartiment cellulaire distinct qui est faiblement associé avec le réticulum endoplasmique et ou la mitochondrie.

Pour explorer davantage la localisation subcellulaire de rGIMAP5, nous avons réalisé le gradient de sucrose à partir de la fraction P10 des lysats de cellules T primaires de rats normaux à 300 psi (figure 12). Le gradient de sucrose permet de séparer les organelles selon leur densité. Cinq fractions contenant différentes organelles ont été générées pour voir la répartition de la protéine d'intérêt. Ainsi rGIMAP5 a été retrouvée uniquement dans la fraction 5, représentant le culot du gradient. Elle n'est pas associée ni avec la mitochondrie, ni avec le réticulum endoplasmique et le cytosquelette. L'explication probable est que rGIMAP5 n'est pas une protéine soluble, mais semble être associée à un complexe moléculaire large ou à un organelle vésiculaire de faible densité.

Les études antérieures ont montré la localisation mitochondriale de hGIMAP5 étiquetée par le GFP (Zenz, T. et al. 2004). L'équipe de Sandal a montré par immunofluorescence, une localisation au centrosome, à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique de hGIMAP5 étiquetée par HA à la partie C-terminale (Sandal, T. et al. 2003). De même, mGIMAP5 avec la partie C-terminale étiquetée par eGFP a été localisée dans la mitochondrie (Nitta, T. et al. 2006a). Le fait que ces études ont porté sur GIMAP5 surexprimée, alors que notre étude a porté sur GIMAP5 endogène pourrait expliquer ces résultats contradictoires.

L'évaluation de la localisation subcellulaire de GIMAP5 étiquetée à la partie N-terminale par microscopie confocale, a révélé que GIMAP5 n'est pas présente dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. En plus elle ne colocalise pas dans l'appareil de Golgi. Par conséquent, il est possible que les différences des résultats observés entre les études antérieures puissent être attribuées à l'interférence d'étiquette à la partie C-terminale. L'explication la plus probable est que dans notre construction, la protéine était étiquetée à la partie N-terminale, puisque GIMAP5 possède des séquences d'insertion membranaires à la partie C-terminale. Les études antérieures, ont utilisé des constructions avec la partie C-terminale étiquetée, ce qui peut modifier les propriétés du ciblage de la protéine. Jusqu'à maintenant, nous ne savons pas l'organelle où GIMAP5 serait localisée. Les travaux de notre laboratoire ont suggéré que le récepteur de la ryanodine est détecté dans la fraction contenant GIMAP5 (Ramanathan, observations non publiées).

Il est connu que les sites d'expression classiques des protéines de la famille Bcl-2 est la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Des études ont montré que des protéines de la famille GIMAP comme mGIMAP5 et mGIMAP3 sont associées physiquement avec les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, ces protéines régulant l'apoptose médiée par la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Récemment, il a été montré que mGIMAP5 était associée avec les protéines Bcl-2 et Bcl-xL dans les cellules T (Nitta, T. et al. 2006a). De plus la réduction de la survie des cellules T causée par la répression de mGIMAP5 est restaurée par l'expression de Bcl-xL (Nitta, T. et al. 2006a). Cela explique un lien fonctionnel entre la régulation de la survie des cellules T par GIMAP5 et la régulation de l'apoptose mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2. D'autres protéines comme mGIMAP4 (IAN1), une protéine connue pour son rôle pro-apoptotique est sélectivement associée à Bax dans le cytoplasme des cellules T (Schnell, S. et al. 2006). Ainsi mGIMAP4 activerait l'apoptose médiée par la mitochondrie à travers son interaction avec Bax. Dans cette présente étude, nous n'avons pas trouvé d'association entre rGIMAP5 avec Bcl-2 et Bax par gradient de sucrose à partir des lysats de cellules T de rats normaux à 300 psi (figure 12) et par immunofluorescence des fibroblastes de rat (Rat-2) transfectés par N-myc-rGIMAP5 (figure 13).

L'ensemble de ces résultats démontre le rôle exclusif de rGIMAP5 dans les lymphocytes T des ganglions lymphatiques et son absence d'expression dans les organelles jusque là connus comme sites majeurs d'expression des protéines GIMAP. Ainsi, contrairement aux différentes études de localisation subcellulaires de GIMAP5, nous n'avons pas trouvé une association significative de rGIMAP5 avec la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique. En plus, rGIMAP5 n'est pas associée avec les protéines Bcl-2 et Bax. La répartition de rGIMAP5 uniquement dans la fraction 5 du gradient du sucrose suppose qu'elle est associée à un organelle vésiculaire de haute densité ou à un complexe moléculaire large.

Il serait pertinent d'élucider davantage la localisation subcellulaire de la protéine native rGIMAP5 dans les organelles par spectrométrie de masse à partir de la fraction 5 en utilisant les cellules EL-4 de la lignée leucémique de souris qui expriment surtout la protéine native GIMAP5. Pour mieux comprendre la fonction de la protéine GIMAP5, il

serait intéressant, par la suite, d'identifier d'autres protéines qui interagissent avec GIMAP5 par co-immunoprécipitation de GIMAP5 avec l'anticorps polyclonal purifié. Le blocage de rGIMAP5 par la technique d'interférence par l'ARN permettra d'étudier les mécanismes qui soutendent son rôle anti-apoptotique.

6- CONCLUSION

Les observations basées sur le phénotype lymphopénique des rats BBDP, ont permis d'attribuer la fonction de pro-survie à GIMAP5. Ainsi, nous avons détecté la protéine GIMAP5 uniquement dans les lymphocytes T primaires des rats normaux. La protéine endogène GIMAP5 est localisée dans un compartiment subcellulaire distinct qui est faiblement associé à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique. GIMAP5 régulerait la survie des lymphocytes T en amont des mitochondries.

7- REMERCIEMENT

En premier lieu, j'aimerais remercier sincèrement, ma directrice de recherche D^r Ramanathan, de l'attention et du soutien qu'il a porté à mon travail de maîtrise. Sa rigueur scientifique, son sens critique, ses nombreuses connaissances, sa disponibilité et sa patience m'ont permis de beaucoup m'améliorer au cours de ma formation scientifique.

J'aimerais remercier mon co-directeur de recherche D^r Ilangumaran pour sa disponibilité et ses nombreuses suggestions au cours de mes travaux de recherche.

Mes remerciements aux membres du jury, soit les D^{rs} Sheela Ramanathan, Claire Dubois, Subburaj Ilangumaran et Darel Hunting pour la lecture et la correction de mon mémoire.

J'exprime mes remerciements à tous les membres du laboratoire pour tous les moments passés ensemble ayant permis à mon intégration au travail et en dehors. Je vous exprime toute mon amitié. Mes remerciements sincères vont à Mme Chantal Leblanc dont l'aide m'a été très précieuse pour apprendre toutes les techniques de base pour réaliser ce travail. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour le temps que tu m'as accordé. J'aimerais remercier profondément Julien Gagnon. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes conseils pertinents à travers de nombreuses discussions pour la réalisation de ce travail scientifique. Je suis certain que tes nombreuses qualités te permettront de réaliser tes projets personnels et professionnels.

Je remercie tous les professeurs et les étudiants, les secrétaires et le personnel technique du programme d'immunologie pour leur gentillesse et leur aide. J'aimerais particulièrement remercier Léonid Volkov pour sa patience et ses explications détaillées lors des prises et des traitements d'images en microscopie confocale.

J'adresse des remerciements spéciaux à ma famille, mon père feu Niafou Kéita et ma mère Kany Coulibaly qui m'ont appris le sens du travail bien fait et la persévérance. Je remercie également les autres membres de ma famille pour leur soutien moral dans les moments les plus difficiles.

J'aimerais aussi remercier le Programme Canadien de Bourse de la Francophonie (PCBF) qui a financé ma bourse d'étude au Canada (deux ans).

Je suis reconnaissant envers mes amis Omar, Nathalie et Louise pour leur soutien et encouragement sur le plan personnel et professionnel afin de faire un dépassement de soi pour surmonter de nombreux obstacles.

8- REFERENCE

- Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Weissman, I. L.; Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice; *Cell*; 89; 1033-41; 1997
- Allen, H. F., Klingensmith, G. J., Jensen, P., Simoes, E., Hayward, A., and Chase, H. P.; Effect of Bacillus Calmette-Guerin vaccination on new-onset type 1 diabetes. A randomized clinical study; *Diabetes Care*; 22; 1703-7; 1999
- Andersen, U. N., Markholst, H., and Hornum, L.; The antiapoptotic gene *Ian411* in the rat: genomic organization and promoter characterization; *Gene*; 341; 141-48; 2004
- Annis, M. G., Zamzami, N., Zhu, W., Penn, L. Z., Kroemer, G., Leber, B., and Andrews, D. W.; Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event; *Oncogene*; 20; 1939-52; 2001
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C.; Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells; *J.Biol.Chem.*; 276; 11615-23; 2001
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.; Apoptosis control by death and decoy receptors; *Curr.Opin.Cell Biol.*; 11; 255-60; 1999
- Atkinson, M. A. and Leiter, E. H.; The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?; *Nat.Med.*; 5; 601-4; 1999
- Awata, T., Guberski, D. L., and Like, A. A.; Genetics of the BB rat: association of autoimmune disorders (diabetes, insulinitis, and thyroiditis) with lymphopenia and major histocompatibility complex class II; *Endocrinology*; 136; 5731-35; 1995
- Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y. Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P. S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S., and Penninger, J. M.; Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b; *Nature*; 403; 211-16; 2000
- Bennett, S. T. and Todd, J. A.; Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes; *Annu.Rev.Genet.*; 30; 343-70; 1996
- Boehme, S. A. and Lenardo, M. J.; Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle; *Eur.J.Immunol.*; 23; 1552-60; 1993
- Bortell, R., Kanaitzuka, T., Stevens, L. A., Moss, J., Mordes, J. P., Rossini, A. A., and Greiner, D. L.; The RT6 (Art2) family of ADP-ribosyltransferases in rat and mouse; *Mol.Cell Biochem.*; 193; 61-68; 1999

- Buzzetti, R., Quattrocchi, C. C., and Nistico, L.; Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence; *Diabetes Metab Rev.*; 14; 111-28; 1998
- Cambot, M., Aresta, S., Kahn-Perles, B., de Gunzburg J., and Romeo, P. H.; Human immune associated nucleotide 1: a member of a new guanosine triphosphatase family expressed in resting T and B cells; *Blood*; 99; 3293-301; 2002
- Chappel, C. I. and Chappel, W. R.; The discovery and development of the BB rat colony: an animal model of spontaneous diabetes mellitus; *Metabolism*; 32; 8-10; 1983
- Colle, E.; Genetic susceptibility to the development of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the rat; *Clin.Immunol.Immunopathol.*; 57; 1-9; 1990
- Colle, E., Guttman, R. D., and Seemayer, T.; Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. I. Association with the major histocompatibility complex; *J.Exp.Med.*; 154; 1237-42; 1981
- Cousins, L., Graham, M., Tooze, R., Carter, C., Miller, J. R., Powrie, F. M., Macpherson, G. G., and Butcher, G. W.; Eosinophilic bowel disease controlled by the BB rat-derived lymphopenia/Gimap5 gene; *Gastroenterology*; 131; 1475-85; 2006
- Crabtree, G. R.; Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation; *Science*; 243; 355-61; 1989
- Daheron, L., Zenz, T., Siracusa, L. D., Brenner, C., and Calabretta, B.; Molecular cloning of lan4: a BCR/ABL-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity; *Nucleic Acids Res.*; 29; 1308-16; 2001
- Dalberg, U., Markholst, H., and Hornum, L.; Both Gimap5 and the diabetogenic BB^{DP} allele of Gimap5 induce apoptosis in T cells; *Int.Immunol.*; 19; 447-53; 2007
- Dion, C., Carter, C., Hepburn, L., Coadwell, W. J., Morgan, G., Graham, M., Pugh, N., Anderson, G., Butcher, G. W., and Miller, J. R.; Expression of the lan family of putative GTPases during T cell development and description of an lan with three sets of GTP/GDP-binding motifs; *Int.Immunol.*; 17; 1257-68; 2005
- Duke, R. C. and Cohen, J. J.; IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells; *Lymphokine Res.*; 5; 289-99; 1986
- Dummer, W., Ernst, B., LeRoy, E., Lee, D., and Surh, C.; Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment; *J.Immunol.*; 166; 2460-2468; 2001
- Elder, M. E. and Maclaren, N. K.; Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat; *J.Immunol.*; 130; 1723-31; 1983

- Ellis, T. M. and Atkinson, M. A.; Early infant diets and insulin-dependent diabetes; *Lancet*; 347; 1464-65; 1996
- Flynn, K. J., Belz, G. T., Altman, J. D., Ahmed, R., Woodland, D. L., and Doherty, P. C.; Virus-specific CD8⁺ T cells in primary and secondary influenza pneumonia; *Immunity*; 8; 683-91; 1998
- Freitas, A. A. and Rocha, B.; Population biology of lymphocytes: the flight for survival; *Annu.Rev.Immunol.*; 18; 83-111; 2000
- Fuks, A., Ono, S. J., Colle, E., and Guttman, R. D.; A single dose of the MHC-linked susceptibility determinant associated with the RT1u haplotype is permissive for insulin-dependent diabetes mellitus in the BB rat; *Exp.Clin.Immunogenet.*; 7; 162-69; 1990
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A.; A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression; *J.Immunol.*; 150; 4244-52; 1993
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N.; c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis; *J.Biol.Chem.*; 280; 14507-13; 2005
- Green, D. R., Droin, N., and Pinkoski, M.; Activation-induced cell death in T cells; *Immunol.Rev.*; 193; 70-81; 2003
- Greiner, D. L., Malkani, S., Kanaitzuka, T., Bortell, R., Doukas, J., Rigby, M., Whalen, B., Stevens, L. A., Moss, J., Mordes, J. P., and Rossini, A. A.; The T cell marker RT6 in a rat model of autoimmune diabetes; *Adv.Exp.Med.Biol.*; 419; 209-16; 1997
- Grillot, D. A., Merino, R., and Nunez, G.; Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice; *J.Exp.Med.*; 182; 1973-83; 1995
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J.; BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis; *Genes Dev.*; 13; 1899-911; 1999
- Gunther, E. and Walter, L.; The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*); *Immunogenetics*; 53; 520-542; 2001
- Hanenberg, H., Kolb-Bachofen, V., Kantwerk-Funke, G., and Kolb, H.; Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats; *Diabetologia*; 32; 126-34; 1989
- Hao, Z., Hampel, B., Yagita, H., and Rajewsky, K.; T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis; *J.Exp.Med.*; 199; 1355-65; 2004

- Hellquist, A., Zucchelli, M., Kivinen, K., Saarialho-Kere, U., Koskenmies, S., Widen, E., Julkunen, H., Wong, A., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Skoog, T., Vendelin, J., Cunninghame-Graham, D. S., Vyse, T. J., Kere, J., and Lindgren, C. M.; The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus; *J.Med.Genet.*; 44; 314-21; 2007
- Hernandez-Hoyos, G., Joseph, S., Miller, N. G., and Butcher, G. W.; The lymphopenia mutation of the BB rat causes inappropriate apoptosis of mature thymocytes; *Eur.J.Immunol.*; 29; 1832-41; 1999
- Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J., and Marrack, P.; Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim; *Immunity.*; 16; 759-67; 2002a
- Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Kappler, J., and Marrack, P.; Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo; *Curr.Opin.Immunol.*; 14; 354-59; 2002b
- Hornum, L., Romer, J., and Markholst, H.; The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in *Ian4*, a positional candidate of *Iddm1*; *Diabetes*; 51; 1972-79; 2002
- Jackson, R., Kadison, P., Buse, J., Rassi, N., Jegasothy, B., and Eisenbarth, G. S.; Lymphocyte abnormalities in the BB rat; *Metabolism*; 32; 83-86; 1983
- Jacob, H. J., Pettersson, A., Wilson, D., Mao, Y., Lernmark, A., and Lander, E. S.; Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat; *Nat.Genet.*; 2; 56-60; 1992
- Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and Pape, K. A.; In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells; *Annu.Rev.Immunol.*; 19; 23-45; 2001
- Joseph, S., Diamond, A. G., Smith, W., Baird, J. D., and Butcher, G. W.; BB-DR/Edinburgh: a lymphopenic, non-diabetic subline of BB rats; *Immunology*; 78; 318-28; 1993
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C.; Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 95; 4997-5002; 1998
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., and Natori, T.; New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia; *Diabetes*; 40; 1375-81; 1991
- Kelekar, A. and Thompson, C. B.; Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis; *Trends Cell Biol.*; 8; 324-30; 1998

- Keppler, O. T., Peter, M. E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., and Pawlita, M.; Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus; *Glycobiology*; 9; 557-69; 1999
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; *Br.J.Cancer*; 26; 239-57; 1972
- Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I., and Krammer, P. H.; TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity; *J.Immunol.*; 165; 6293-300; 2000
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D.; The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis; *Science*; 275; 1132-36; 1997
- Knip, M. and Akerblom, H. K.; Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus; *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*; 107 Suppl 3; S93-100; 1999
- Kolb, H., Worz-Pagenstert, U., Kleemann, R., Rothe, H., Rowsell, P., and Scott, F. W.; Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines; *Diabetologia*; 39; 1448-54; 1996
- Krammer, P. H.; CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die; *Adv.Immunol.*; 71; 163-210; 1999
- Krammer, P. H.; CD95's deadly mission in the immune system; *Nature*; 407; 789-95; 2000
- Kroemer, G.; Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution; *Cell Death.Differ.*; 4; 443-56; 1997
- Krucken, J., Epe, M., Benten, W. P., Falkenroth, N., and Wunderlich, F.; Malaria-suppressible expression of the anti-apoptotic triple GTPase mGIMAP8; *J.Cell Biochem.*; 96; 339-48; 2005
- Krucken, J., Schmitt-Wrede, H. P., Markmann-Mulisch, U., and Wunderlich, F.; Novel gene expressed in spleen cells mediating acquired testosterone-resistant immunity to *Plasmodium chabaudi* malaria; *Biochem.Biophys.Res.Comm.*; 230; 167-70; 1997
- Krucken, J., Schroetel, R. M., Muller, I. U., Saidani, N., Marinovski, P., Benten, W. P., Stamm, O., and Wunderlich, F.; Comparative analysis of the human gimap gene cluster encoding a novel GTPase family; *Gene*; 341; 291-304; 2004

- Krucken, J., Stamm, O., Schmitt-Wrede, H. P., Mincheva, A., Lichter, P., and Wunderlich, F.; Spleen-specific expression of the malaria-inducible intronless mouse gene *imap38*; *J.Biol.Chem.*; 274; 24383-91; 1999
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S.; Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex; *J.Biol.Chem.*; 276; 20633-40; 2001
- Kupfer, R., Lang, J., Williams-Skipp, C., Nelson, M., Bellgrau, D., and Scheinman, R. I.; Loss of a *gimap/ian* gene leads to activation of NF-kappaB through a MAPK-dependent pathway; *Mol.Immunol.*; 44; 479-87; 2007
- Lang, J. A., Kominski, D., Bellgrau, D., and Scheinman, R. I.; Partial activation precedes apoptotic death in T cells harboring an IAN gene mutation; *Eur.J.Immunol.*; 34; 2396-406; 2004
- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H.; Caspases: pharmacological manipulation of cell death; *J.Clin.Invest.*; 115; 2665-72; 2005
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J.; The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology; *Cell*; 104; 487-501; 2001
- MacMurray, A. J., Moralejo, D. H., Kwitek, A. E., Rutledge, E. A., Van, Yserloo B., Gohlke, P., Speros, S. J., Snyder, B., Schaefer, J., Bieg, S., Jiang, J., Ettinger, R. A., Fuller, J., Daniels, T. L., Pettersson, A., Orlebeke, K., Birren, B., Jacob, H. J., Lander, E. S., and Lernmark, A.; Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (*lan*)-related gene; *Genome Res.*; 12; 1029-39; 2002
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B. C., Swanson, B., and Kappler, J.; Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells; *Nat.Immunol.*; 1; 107-11; 2000
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E.; FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC); *EMBO J.*; 16; 2794-804; 1997
- Mordes, J. P., Bortell, R., Blankenhorn, E. P., Rossini, A. A., and Greiner, D. L.; Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity; *ILAR.J.*; 45; 278-91; 2004
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H.; p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs; *J.Exp.Med.*; 188; 2033-45; 1998
- Nagata, S.; Apoptosis by death factor; *Cell*; 88; 355-65; 1997

- Nicholson, D. W.; Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death; *Cell Death.Differ.*; 6; 1028-42; 1999
- Nitta, T., Nasreen, M., Seike, T., Goji, A., Ohigashi, I., Miyazaki, T., Ohta, T., Kanno, M., and Takahama, Y.; IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes; *PLoS.Biol.*; 4; e103; 2006a
- Nitta, T. and Takahama, Y.; The lymphocyte guard-IANs: regulation of lymphocyte survival by IAN/GIMAP family proteins; *Trends Immunol.*; 2006b
- Nossal, G. J.; Negative selection of lymphocytes; *Cell*; 76; 229-39; 1994
- Page, D. M., Roberts, E. M., Peschon, J. J., and Hedrick, S. M.; TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection; *J.Immunol.*; 160; 120-133; 1998
- Pandarpurkar, M., Wilson-Fritch, L., Corvera, S., Markholst, H., Hornum, L., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Rossini, A. A., and Bortell, R.; *Ian4* is required for mitochondrial integrity and T cell survival; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 100; 10382-87; 2003
- Parfrey, N. A., Prud'Homme, G. J., Colle, E., Fuks, A., Seemayer, T. A., Guttman, R. D., and Ono, S. J.; Immunologic and genetic studies of diabetes in the BB rat; *Crit Rev.Immunol.*; 9; 45-65; 1989
- Payne, F., Smyth, D. J., Pask, R., Barratt, B. J., Cooper, J. D., Twells, R. C., Walker, N. M., Lam, A. C., Smink, L. J., Nutland, S., Rance, H. E., and Todd, J. A.; Haplotype tag single nucleotide polymorphism analysis of the human orthologues of the rat type 1 diabetes genes *Ian4* (*Lyp/Iddm1*) and *Cblb*; *Diabetes*; 53; 505-9; 2004
- Penit, C., Lucas, B., and Vasseur, F.; Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice; *J.Immunol.*; 154; 5103-13; 1995
- Plamondon, C., Kottis, V., Brideau, C., Metroz-Dayer, M. D., and Poussier, P.; Abnormal thymocyte maturation in spontaneously diabetic BB rats involves the deletion of CD4-8+ cells; *J.Immunol.*; 144; 923-28; 1990
- Poirier, G. M., Anderson, G., Huvar, A., Wagaman, P. C., Shuttleworth, J., Jenkinson, E., Jackson, M. R., Peterson, P. A., and Erlander, M. G.; Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1) is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants; *J.Immunol.*; 163; 4960-4969; 1999
- Prins, J. B., Herberg, L., Den, Bieman M., and van Zutphen, L. F.; Genetic variation within and between lines of diabetes-prone and non-diabetes-prone BB rats; allele distribution of 8 protein markers; *Lab Anim*; 25; 207-11; 1991

- Ramanathan, S., Marandi, L., and Poussier, P.; Evidence for the extrathymic origin of intestinal TCRgammadelta(+) T cells in normal rats and for an impairment of this differentiation pathway in BB rats; *J.Immunol.*; 168; 2182-87; 2002
- Ramanathan, S., Norwich, K., and Poussier, P.; Antigen activation rescues recent thymic emigrants from programmed cell death in the BB rat; *J.Immunol.*; 160; 5757-64; 1998
- Ramanathan, S. and Poussier, P.; BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes; *Immunol.Rev.*; 184; 161-71; 2001
- Reuber, T. L. and Ausubel, F. M.; Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes; *Plant Cell*; 8; 241-49; 1996
- Rothenberg, E. V.; The development of functionally responsive T cells; *Adv.Immunol.*; 51; 85-214; 1992
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von, Boehmer H.; Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene; *Science*; 266; 1208-12; 1994
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.; Caspase activation: the induced-proximity model; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 96; 10964-67; 1999
- Sandal, T., Aumo, L., Hedin, L., Gjertsen, B. T., and Doskeland, S. O.; Irod/Ian5: an inhibitor of gamma-radiation- and okadaic acid-induced apoptosis; *Mol.Biol.Cell*; 14; 3292-304; 2003
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E.; Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways; *EMBO J.*; 17; 1675-87; 1998
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E.; Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells; *J.Biol.Chem.*; 274; 22532-38; 1999
- Schluns, K. S. and Lefrancois, L.; Cytokine control of memory T-cell development and survival; *Nat.Rev.Immunol.*; 3; 269-79; 2003
- Schnell, S., Demolliere, C., van den, Berk P., and Jacobs, H.; Gimap4 accelerates T-cell death; *Blood*; 108; 591-99; 2006
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E.; Apoptosis signaling by death receptors; *Eur.J.Biochem.*; 254; 439-59; 1998
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S.; Selection of the T cell repertoire; *Annu.Rev.Immunol.*; 17; 829-74; 1999

- Serreze, D. V. and Leiter, E. H.; Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice; *Curr.Dir.Autoimmun.*; 4; 31-67; 2001
- Shin, J. H., Janer, M., McNeney, B., Blay, S., Deutsch, K., Sanjeevi, C. B., Kockum, I., Lernmark, A., and Graham, J.; IA-2 autoantibodies in incident type I diabetes patients are associated with a polyadenylation signal polymorphism in GIMAP5; *Genes Immun.*; 8; 503-12; 2007
- Shortman, K. and Wu, L.; Early T lymphocyte progenitors; *Annu.Rev.Immunol.*; 14; 29-47; 1996
- Spaner, D., Raju, K., Rabinovich, B., and Miller, R. G.; A role for perforin in activation-induced T cell death in vivo: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice; *J.Immunol.*; 162; 1192-99; 1999
- Stamm, O., Krucken, J., Schmitt-Wrede, H. P., Benten, W. P., and Wunderlich, F.; Human ortholog to mouse gene *imap38* encoding an ER-localizable G-protein belongs to a gene family clustered on chromosome 7q32-36; *Gene*; 282; 159-67; 2002
- Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., and Cory, S.; Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis; *EMBO J.*; 14; 6136-47; 1995
- Strasser, A. and Pellegrini, M.; T-lymphocyte death during shutdown of an immune response; *Trends Immunol.*; 25; 610-615; 2004
- Surh, C. D. and Sprent, J.; T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus; *Nature*; 372; 100-103; 1994
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T., and Nagata, S.; Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand; *Cell*; 76; 969-76; 1994
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D.; IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 98; 8732-37; 2001
- Todd, D. J., Forsberg, E. M., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Rossini, A. A., and Bortell, R.; Deficiencies in gut NK cell number and function precede diabetes onset in BB rats; *J.Immunol.*; 172; 5356-62; 2004
- Vander Heiden, M. G. and Thompson, C. B.; Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?; *Nat.Cell Biol.*; 1; E209-E216; 1999

- Vidugiriene, J., Sharma, D. K., Smith, T. K., Baumann, N. A., and Menon, A. K.; Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum; *J.Biol.Chem.*; 274; 15203-12; 1999
- von, Boehmer H.; Positive selection of lymphocytes; *Cell*; 76; 219-28; 1994
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S.; Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis; *Nature*; 356; 314-17; 1992
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J.; Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death; *Science*; 292; 727-30; 2001
- Woda, B. A., Like, A. A., Padden, C., and McFadden, M. L.; Deficiency of phenotypic cytotoxic-suppressor T lymphocytes in the BB/W rat; *J.Immunol.*; 136; 856-59; 1986
- Yale, J. F., Grose, M., and Marliss, E. B.; Time course of the lymphopenia in BB rats. Relation to the onset of diabetes; *Diabetes*; 34; 955-59; 1985
- Yokoi, N., Kanazawa, M., Kitada, K., Tanaka, A., Kanazawa, Y., Suda, S., Ito, H., Serikawa, T., and Komeda, K.; A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat; *J.Clin.Invest*; 100; 2015-21; 1997
- Yokoi, N., Namae, M., Fuse, M., Wang, H. Y., Hirata, T., Seino, S., and Komeda, K.; Establishment and characterization of the Komeda diabetes-prone rat as a segregating inbred strain; *Exp.Anim*; 52; 295-301; 2003
- Zenz, T., Roessner, A., Thomas, A., Frohling, S., Dohner, H., Calabretta, B., and Daheron, L.; hlan5: the human ortholog to the rat lan4/lddm1/lyp is a new member of the lan family that is overexpressed in B-cell lymphoid malignancies; *Genes Immun.*; 5; 109-16; 2004
- Zlotnik, A. and Moore, T. A.; Cytokine production and requirements during T-cell development; *Curr.Opin.Immunol.*; 7; 206-13; 1995